ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1982 N° 1

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'EPIDIDYMITE CONTAGIEUSE DU BELIER

1. Mise au point de deux techniques sérologiques

2. Etude épidémiologique dans les Hautes-Pyrénées

THESE

POUR LE DOCTORAT VETERINAIRE
(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

DOLLEY Philippe, Lucien, Olivier
Né, le 4 Août 1957 à Paris (16e)

MEMBRES DU JURY

MM. ARMENGAUD
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse
LAUTIE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
FERNEY
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

UNIV.
LEIDEN
1892.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547622_0008

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1982 N° 1

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'EPIDIDYMITE CONTAGIEUSE DU BELIER

1. Mise au point de deux techniques sérologiques

2. Etude épidémiologique dans les Hautes-Pyrénées

THESE

POUR LE DOCTORAT VETERINAIRE
(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

DOLLEY Philippe, Lucien, Olivier
Né, le 4 Août 1957 à Paris (16e)

MEMBRES DU JURY

MM. ARMENGAUD
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse
LAUTIE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
FERNEY
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	M. LAUTIE
Directeur honoraire	M. FLORIO
Professeurs honoraires	MM. BRIZARD
	SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire	M. GODFRAIN
Professeur sans chaire	MMe BURGAT-SACAZE

Pharmacie et toxocologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire	MM. RICO
Professeur sans chaire	BRAUN
Maître-Assistant	BENARD

Physique et biologie médicale

Chimie biologique et médicale

Informatique biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire	MM. PAVAUX
Maître-Assistant	LIGNEREUX
Maître-Assistant	SAUTET

Organogénèse - Tératologie

Anatomie générale - Anatomie appliquée

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE, PHARMACODYNAMIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire	MM. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire	FARGEAS
Maître-Assistant Agrégé	TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie

Thérapeutique

.../

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... MM. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... CABANIE
Maître-Assistant Agrégé ..... MAGNOL
Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique - Clinique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... MM. LABIE
Maître de Conférences ..... EECKOUTTE
Maître Assistant Agrégé ..... Mme BENARD
Hygiène, Inspection, Contrôle et
Technologie des denrées alimentaires
d'origine animale - Clinique

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... MM. DORCHIES
Maître de Conférences ..... FRANC
Maître Assistant ..... DUCOS DE LAHITTE
Zoologie appliquée - Ecologie
Parasitologie externe - Dermatologie
Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES ET DE LEGISLATION

Professeur titulaire ..... MM. LESCURE
Maître de Conférences ..... GUELFI
Maître Assistant ..... REGNIER
Sémiologie et Pathologie Médicale des
Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie
Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... MM. TOURNUT
Maître de Conférences ..... BEZILLE
Maître Assistant ..... JOUGLAR
Sémiologie et Pathologie Médicale
du Bétail et des Animaux de basse-cour
Clinique - Consultation itinérante

.../

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire ..... MM. CAZIEUX
Maître Assistant Agrégé ..... GENEVOIS
Maître Assistant ..... AUTEFAGE

Propédeutique et Sémiologie chirurgicale
Radiologie - Technique chirurgicale -
Anesthésiologie - Pathologie chirurgicale
Traumatologie - Podologie orthopédique -
Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... MM. FERNEY
Professeur sans chaire ..... ROYAL

Pathologie de l'appareil génital et de la
mamelle - Sémiologie et Propédeutique -
Pathologie de la Reproduction -
Obstétrique et Pathologie du nouveau-né
Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES -
LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... MM. CHANTAL
Maître Assistant ..... PICAVET

Epidémiologie - Maladies contagieuses
Zoonoses - Législation sanitaire -
Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE -
IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... MM. LAUTIE
Maître Assistant ..... PELLERIN

Microbiologie - Immunologie -
Pathologie générale

CHAIRE D'ELEVAGE ET ECONOMIE

Professeur titulaire ..... MM. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... DARRE
Maître Assistant ..... Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique animale -
Extérieur - Zootechnie et économie générales
Ethologie appliquée, Sciences, Techniques,
Economie de l'élevage et des productions animales
Insémination artificielle - Organisation
de l'Elevage

.../

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... MM. FALIU

Professeur sans chaire ..... GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie

Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les professeurs ANGELIER, ARMENGAUD, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET et MAZENC.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (déliberation de la Faculté en date du 10 Mai 1891 et du conseil de l'Ecole en date du 13 Juin 1924)

A MES PARENTS
Ce travail est un peu le leur.
Avec tout mon amour.

A MA FEMME
En gage de tout ce que nous construirons ensemble.

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur ARMENGAUD
de l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Qui nous a fait le très grand honneur de
présider notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur LAUTIE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Il nous a reçu dans son service et nous a guidé
dans l'élaboration de cette thèse.
Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance
et de notre respect.

Monsieur le Professeur FERNEY
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui a su nous faire profiter de son enseignement.
Nous le remercions vivement d'avoir accepté
de juger ce travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont aidé dans l'élaboration de cette thèse:

Aux collaborateurs du service de Microbiologie, Immunologie et Pathologie générale de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, et plus particulièrement

Monsieur PELLERIN, Maître-assistant

Monsieur MILON, Assistant

Mademoiselle GERAL, Ingénieur I.N.R.A.

Madame LACAZE, Technicienne

Mademoiselle BOURY, Technicienne

Pour l'acceuil qu'ils nous ont réservé dans leur service et leurs précieux conseils.

A l'Institut Mérieux en la personne du docteur DEMESTRE, qui nous a aimablement fourni les souches indispensables à notre expérimentation.

P L A N

INTRODUCTION p. 1

DEFINITION, IMPORTANCE p. 2

HISTORIQUE p. 3

PREMIERE PARTIE. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A - ETUDE DE LA MALADIE p. 7

1 - ETUDE DE L'AGENT INFECTIEUX p. 7

a - Caractères culturaux et biochimiques p. 7

b - Pouvoir pathogène p. 8

c - Constitution antigénique et pouvoir immunogène p. 8

2 - EPIDEMIOLOGIE p. 9

a - Epidémiologie descriptive p. 9

b - Epidémiologie analytique p.10

c - Epidémiologie synthétique p.12

3 - PATHOGENIE p.13

4 - SYMPTOMES ET DIAGNOSTIC CLINIQUE p.13

a - Chez le mâle p.13

b - Chez la femelle p.15

5 - LESIONS p.16

a - Chez le mâle p.16

b - Chez la femelle p.18

c - Chez le foetus p.18

6 - TRAITEMENT p.19

7 - PROPHYLAXIE p.19

a - Prophylaxie médicale p.19

b - Prophylaxie sanitaire p.20

c - Conclusion: méthode d'éradication de la maladie p.21

8 - LEGISLATION p.22

B - DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL p.23
1 - DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE p.23
a - Prélèvements p 23
b - Isolement p.23
c - Identification p.24
2 - DIAGNOSTIC ALLERGIQUE p.24
3 - DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE p.25
a - Eventail des techniques p.26
b - Etude critique p.29

DEUXIEME PARTIE. TRAVAUX PERSONNELS

I - MISE AU POINT DES TESTS E.L.I.S.A. ET I.F.I.
COMPARAISON AVEC LA FIXATION DU COMPLEMENT. p.35
A - MATERIEL ET METHODES p.35
1 - Fixation du complément p.35
2 - Immunofluorescence indirecte (I.F.I.) p.36
3 - Test immunoenzymatique (E.L.I.S.A.) p.41
B - ETUDE COMPARATIVE p.52
1 - R.F.C. et I.F.I. p.53
2 - R.F.C. et E.L.I.S.A. p.54
3 - I.F.I. et E.L.I.S.A. p.56
4 - Profils sérologiques p.58
C - DISCUSSION p.59
1 - Valeur biologique des trois techniques p.59
2 - Valeur technique p.60

II - ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE DANS LE DEPARTEMENT
DES HAUTES PYRENEES p.63

A - BASES DE L'ENQUETE p.63
1 - Organisation de l'élevage ovin dans le département p.63
2 - Résultats antérieurs p.64
B - METHODOLOGIE p.65
1 - Collecte des échantillons p.65
2 - Analyse des serums p.66
C - RESULTATS p.66
1 - Taux d'infection global p.66
2 - Taux d'infection local p.67
D - DISCUSSION p.67
1 - Renseignements épidémiologiques p.67
2 - Comparaison avec les résultats antérieurs p.69

CONCLUSION GENERALE p.71

L'épididymite contagieuse du bélier est une maladie que l'on a longtemps ignorée en France, alors qu'elle représente depuis longtemps un problème majeur pour l'élevage ovin de certains pays.

Tenter de faire le point sur cette maladie dans une région française nous a donc paru intéressant, et cela fera l'objet de la dernière partie de ce travail.

Mais, comme pour toutes les brucelloses, le diagnostic de laboratoire se heurte au problème de la fiabilité des réactions sérologiques, qui représentent un moyen beaucoup plus sûr et efficace que l'isolement du germe. C'est ce qui nous a incité à adapter deux techniques modernes, déjà appliquées dans le diagnostic sérologique des brucelloses humaines.

Après une première partie consacrée à une mise au point bibliographique sur la maladie et son diagnostic, la deuxième partie est consacrée aux observations personnelles réalisées au cours de ces deux travaux expérimentaux complémentaires.

DEFINITION

Le terme d' "Epididymite contagieuse du bélier" a été adopté par la législation française pour désigner l'inflammation de l'épididyme, accompagnée ou non de celle du testicule, provoquée par l'infection à Brucella ovis des béliers. Le législateur a ainsi voulu séparer cette entité pathologique des autres brucelloses, cela pour des raisons tant épidémiologiques que cliniques.

IMPORTANCE

L'importance de cette maladie en France est encore mal connue. Les travaux de GIAUFFRET et SANCHIS (42) (43) (44) (110) révèlent un taux moyen d'infection de 4 à 5 p.100 dans le Sud-Est de la France.

Au niveau mondial, l'Australie et la Nouvelle Zélande, pays très gros producteurs de mouton, payent le plus lourd tribut à cette maladie. C'est dans ces régions que la maladie a d'abord été mise en évidence, puis largement étudiée. Avant la mise en place de mesures prophylactiques draconiennes, le taux d'infection des béliers y était en moyenne de 30 à 40 p.100 dans les grands troupeaux, allant même jusqu'à 70 p.100 lors de certains grands rassemblements d'animaux.

Aujourd'hui, la maladie a été retrouvée dans tout le continent américain, l'Afrique du Sud, les pays d'Europe de l'Est et le bassin méditerranéen. Elle provoque de sérieuses perturbations économiques dans les pays d'enzootie (Australie et Nouvelle Zélande surtout) par les problèmes de stérilité qu'elle entraine. De plus, elle provoque d'importantes dépenses de prophylaxie, son éradication nécéssitant de gros efforts plusieurs années consécutives.

HISTORIQUE

Dès 1942, GUNN et coll. (52) se sont inquiétés de la grande fréquence des épididymites atteignant les béliers en Australie. Ces inquiétudes sont restées lettre morte jusqu'en 1952, année où des chercheurs australiens et néo-zélandais ont simultanément mis en évidence la maladie et son agent étiologique.

En Australie, ce sont Mc FARLANE et Coll. (35) d'une part, et SIMMONS et HALL (115) d'autre part, qui mettent en évidence un bacille Gram négatif à partir d'épididymites de béliers. De plus, Mc FARLANE montre qu'il est possible de reproduire expérimentalement la maladie.

En Nouvelle Zélande, BUDDLE et BOYES (20) isolent ce même germe Gram négatif d'une lésion d'épididymite de bélier, et tentent de préciser sa nature. Ils concluent que l'agent responsable de cette maladie est probablement un mutant de Brucella melitensis.

Dès lors, de nombreux travaux se succèdent. En Australie, CLAPP (24), HALL (53) et MILLER (84) reprennent ces travaux et confirment l'étiologie proposée par BUDDLE; ils proposent de nommer ce germe: "Brucella like organism" (B.L.O.), terme repris par les auteurs néo-zélandais qui travaillent sur ce problème.

En 1956, BUDDLE baptise le germe Brucella ovis et fait parvenir une souche à l'Institut Pasteur de Tunis, où RENOUX (102) confirme l'appartenance de ce germe au genre Brucella et propose une représentation schématique de la structure antigénique des Brucella en supposant Brucella ovis porteuse d'un nouvel antigène appelé Ag Z.

Cette même année, Mc GOWAN et SHULTZ (50) signalent la maladie aux Etats Unis.

En 1958, l'épididymite contagieuse du bélier est mise en évidence en Afrique du Sud par Van HEERDEN et Van RENSBURG (57).

Elle est enfin décrite dans de nombreux pays d'Europe de

l'Est, dès 1959 par TUDORIU et Coll. (125).

La place de ce germe dans la taxonomie bactérienne a été longtemps discutée. Comme nous l'avons vu, BUDDLE l'a d'abord identifiée comme un mutant de Brucella melitensis, puis nommée Brucella ovis, confirmé en cela par les travaux de RENOUX. En 1956, MEYER et CAMERON (82) réfutent cette thèse et, s'appuyant sur des critères biochimiques, classent ce germe dans le genre Neisseria. De nombreux articles parurent dans les années 1960, et en 1970, SWIFT (118) propose le terme de "Ram epididymitis organism" (R.E.O.).

C'est à cette époque que les progrès réalisés en bactériologie, immunologie et génétique bactérienne permettent de confirmer les hypothèses de BUDDLE et de nommer définitivement le germe Brucella ovis. (Sous-comité de taxonomie des Brucella en 1970). Cela est du notamment aux travaux de DIAZ et BOSSERAY (31), de MEYER (82) (83) et de MORRIS (87). En effet, chez tous les membres du genre Brucella, les séquences de polynucléotides présentent de nettes similitudes. Pour Brucella abortus, B. suis et B. melitensis, l'homologie est complète, alors qu'il manque à l'A.D.N. de Brucella ovis certaines séquences de polynucléotides communes aux autres espèces du genre, à la suite, semble-t-il, d'une délétion chromosomique naturelle. Le fait qu'une forte proportion de polynucléotides de Brucella ovis sont analogues à ceux des autres espèces du genre justifie néammoins son inclusion dans le genre.

PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA MALADIE ET DE SON DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL.

A - ETUDE DE LA MALADIE

1 - ETUDE DE L'AGENT INFECTIEUX

a - Caractères culturaux et biochimiques

Brucella ovis est un petit bacille Gram négatif, colorable par la méthode de Stamp. Sa culture nécessite une tension en CO2 (10 à 20 p.100) et une température de 34 à 37 degrés Celsius. Elle est inhibée sur le milieu de Renoux. BROWN et Coll. (15) ont proposé un milieu sélectif qui s'est révélé très efficace à l'usage (ALTON et Coll.) (2) et est actuellement employé régulièrement pour l'isolement de ce germe. Il s'agit du milieu de Thayer- Martin, légèrement modifié dans sa composition et auquel on ajoute du nitrofurantoïne.

Dans les conditions optimales de croissance, on obtient, en 4 à 10 jours, des petites colonies de taille variable (0,2 à 0,5 mm), convexes, translucides, grisâtres au centre et non hémolytiques.

Tous les auteurs s'accordent pour noter que, lors du premier isolement, Brucella ovis se présente en phase R.

D'un point de vue biochimique, Brucella ovis se distingue des autres espèces du genre par les caractères suivants:

- elle ne possède ni oxydase, ni uréase.
- elle ne réduit pas les nitrates en nitrites.
- elle n'oxyde ni le glucose, ni l'érythritol.
- elle est insensible à l'action des phages couramment utilisés.

Ces différences entre Brucella ovis et les trois espèces "classiques" (Brucella melitensis, B. suis et B. abortus) en font donc bien une espèce à part et bien individualisée dans le genre.

Toutefois, MEYER (83) a pu induire une mutation de Brucella abortus type 2 par la progestérone. Ce mutant en phase R était tout à fait

semblable biochimiquement à Brucella ovis. D'autre part, Brucella ovis en cultures agées passe en phase S et présente alors des antigènes de surface identiques à ceux des autres espèces du genre.

On peut donc s'interroger sur la stabilité de Brucella ovis en tant qu'espèce.

b - Pouvoir pathogène

Comme toutes les Brucella, Brucella ovis possède un très net tropisme génital. Mais contrairement aux autres, on n'a jamais pu mettre en évidence d'atteinte extra-génitale, notamment articulaire.

Cette bactérie possède en outre un fort tropisme d'espèce, dirigé vers les petits ruminants et tout particulièrement vers les ovins.

D'un point de vue quantitatif, on a pu modifier le pouvoir pathogène de ce germe, ce qui conduit à la fabrication de vaccins vivants atténués. Il n'a jamais été clairement démontré de variation naturelle du pouvoir pathogène.

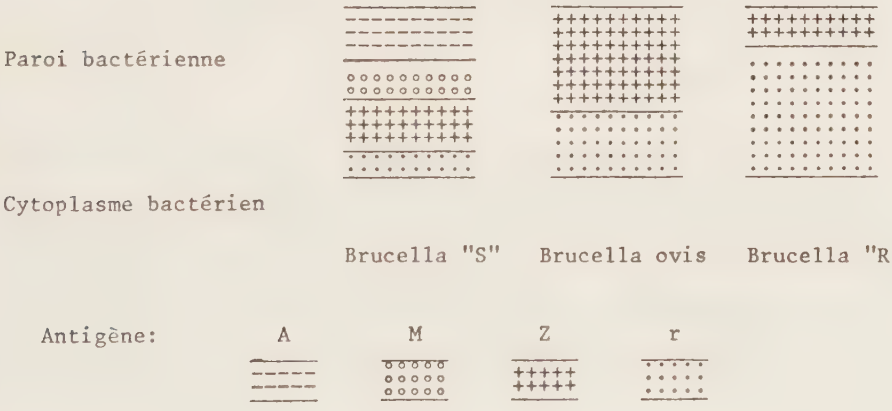
c - Constitution antigénique et pouvoir immunogène

RENOUX (102), DIAZ et BOSSERAY (31) ont montré, à des époques différentes, que Brucella ovis présente un antigène de surface caractéristique qui peut être utilisé à des fins diagnostiques. En effet, cette bactérie se présentant toujours en phase R au premier isolement extériorise un antigène appelé Z par Renoux et R par Diaz. Cet antigène semblerait posséder certains déterminants communs avec ceux extraits d'autres Brucella en phase R, notamment Brucella canis. Cela pourrait donc expliquer les réactions sérologiques croisées obtenues par de nombreux auteurs. Ce phénomène est d'ailleurs utilisé dans le diagnostic sérologique de la brucellose canine pour lequel on utilise un antigène préparé à partir de souches de Brucella ovis.

L'inoculation de Brucella ovis à un bélier provoque la formation d'anticorps spécifiques utilisables pour le diagnostic sérologique de la maladie. Elle induit aussi une immunité de type cellulaire comme le montrent les expériences de diagnostic allergique de HALL (53).

Après l'inoculation, les IgM apparaissent les premières (vers le 5° - 7° jour), suivies des IgG dont le taux atteint son maximum vers le 60° jour (MASALSKI) (79).

Figure 1. Représentation schématique de la répartition des antigènes des Brucella (d'après RENOUX)



2 - EPIDEMIOLOGIE

a - Epidémiologie descriptive

L'épididymite contagieuse du bélier est une maladie de

répartition mondiale. Son extension est superposable à celle de l'élevage ovin en général. On peut toutefois mettre en évidence une différence entre les pays du Nouveau Monde et l'Europe. En effet, si dans les pays européens Brucella ovis coexiste avec Brucella melitensis, cette dernière semble être retrouvée exceptionnellement en Australie, en Nouvelle Zélande et aux Etats Unis.

Les données sur l'extension de l'infection en France sont encore très fragmentaires. Différents sondages sérologiques ont pu la mettre en évidence dans de nombreuses régions françaises d'élevage, mais le problème semble se poser avec le plus d'acuité dans le Sud-Est et le Sud-Ouest (Travaux de GIAUFFRET et SANCHIS, résultats d'enquêtes menées dans les haras du Sud-Ouest).

b - Epidémiologie analytique

Sources d'infection

La source majeure de germes est représentée par les béliers atteints qui excrètent les Brucella par leur sperme. Les béliers sains se contaminent lors du coït avec une brebis préalablement infectée par un bélier porteur. Ils peuvent aussi être contaminés par homosexualité lors des grands rassemblements de béliers (haras, concours). D'après BROWN (14) la contamination par voie orale sur les prairies joue un rôle négligeable du fait de la faible résistance du germe dans le milieu extérieur.

Voies de pénétration

Dans les conditions naturelles, la contamination s'effectue par voie vénérienne. Expérimentalement, de nombreuses voies ont été utilisées avec succès, notamment intra-veineuse et conjonctivale.

Matières virulentes

Chez le mâle, le seul mode d'excrétion du germe est représenté par le sperme. Selon JONES (64), KEOGH (69) et WEBB (129), l'excrétion de Brucella ovis est rarement décelable chez les béliers ne présentant pas de lésions. Chez les béliers atteints, la bactérie est le plus souvent présente, avec de rares phases d'éclipse.

La femelle joue un rôle beaucoup plus passif dans la transmission de la maladie. Hors période de lutte, le mucus vaginal représente un milieu dysgénésique pour Brucella ovis. Ce n'est qu'en période d'oestrus que les sécrétions vaginales permettent le développement du germe et deviennent une source de contamination pour le bélier.

Facteurs de réceptivité

+ L'espèce

Brucella ovis présente un tropisme d'epèce très marqué. Elle n'atteint en effet que les petits ruminants dans les conditions naturelles. GARCIA-CARILLO et coll. (37) ont montré que les boucs sont beaucoup moins sensibles que les béliers.

Il n'a jamais été signalé d'infection humaine par Brucella ovis.

+ Le sexe

Comme nous l'avons vu auparavant, seuls les mâles représentent un terrain toujours favorable à la multiplication du germe. Les femelles ne permettent sa multiplication qu'à des moments précis de leur cycle sexuel, et se stérilisent bactériologiquement d'une année à l'autre, tout en présentant une réaction sérologique fugace et de faible

intensité. (HUGES)(61), (LAUERMANN)(74), (RYAN)(109).

+ L'âge

Les animaux ne peuvent être atteints qu'après leur maturité sexuelle. D'après CLAPP (25), l'âge ne semble pas jouer d'autre rôle dans la sensibilité des béliers à Brucella ovis.

+ La race

De nombreux auteurs ont constaté une sensibilité supérieure chez les races anglaises par rapport au mérinos, sans tenter d'expliquer ce phénomène. Ces constatations restent toutefois discutables, aucun auteur n'ayant discuté ses résultats au vu des proportions respectives des races dans leur pays.

+ L'individu

Des variations individuelles de sensibilité n'ont été signalées que chez les brebis, en fonction de leur cycle sexuel. On peut par ailleurs admettre que les béliers présentent une sensibilité variable à l'action de Brucella ovis puisque certains n'extériorisent jamais de lésion après leur infection par ce germe.

c - Epidémiologie synthétique

L'épididymite contagieuse des béliers atteint les animaux pubères. Son extension se calque sur celle de l'élevage ovin, et elle revêt une grande importance dans les troupeaux possédant de nombreux béliers. Sa dissémination est assurée à la faveur de la lutte, mais aussi lors des grands rassemblements de béliers (concours, foires, expositions),

où l'homosexualité entre béliers assure une large extension de la maladie.

3 - PATHOGENIE

BIBERSTEIN et Coll. (11) ont constaté, après inoculation conjonctivale de Brucella ovis à de jeunes béliers indemnes, que le germe se disperse lentement par voie lymphatique pour atteindre l'épididyme en 45 jours. Après localisation épididymaire, on ne peut le retrouver dans le système lymphatique qu'au niveau des ganglions inguinaux profonds et superficiels. La bactérie agit essentiellement par sa virulence. CUBA-CAPARO et MYERS (29) ont montré que le modèle d'étude expérimental de la maladie est la gerbille, seul animal de laboratoire à présenter des lésions d'épididymite comparables à celles du bélier après inoculation.

4 - SYMPTOMES ET DIAGNOSTIC CLINIQUE

a - Chez le mâle

L'épididymite contagieuse peut revêtir chez le bélier soit une forme aiguë, soit une forme chronique, soit une forme inapparente. De très nombreux béliers n'extériorisent pas cliniquement l'infection par Brucella ovis, bien qu'il soit possible de retrouver le germe dans leur sperme. Ceux là sont donc détectés par la sérologie. Les individus qui expriment cliniquement la maladie le font rarement sous une forme aiguë (environ 10 p.100 des cas) suivie d'une forme chronique, mais le plus souvent d'emblée sous une forme chronique.

Forme aiguë

Le bélier présente dans ce cas une fièvre modérée avec abattement, inappétence, légère prostration. Les testicules sont rouges,

chauds, oedématiés et leur palpation provoque une réaction douloureuse de l'animal. La démarche est hésitante, et le sujet reste souvent debout, immobile, postérieurs écartés. Cette phase aiguë dure une dizaine de jours, puis les symptômes généraux disparaissent peu à peu, laissant place à la forme chronique de la maladie. Il n'a jamais été signalé de mort de l'animal durant cette période.

Forme chronique

C'est la forme la plus fréquente de la maladie. Elle peut faire suite à une phase aiguë ou prendre place d'emblée, cas le plus généralement observé.

Les symptômes s'installent progressivement et siègent uniquement au niveau des testicules. On remarque tout d'abord une légère tuméfaction non douloureuse, froide, au niveau de la queue de l'épididyme. Cette tuméfaction s'étend progressivement au corps, puis à la tête de l'épididyme, atteignant dans certains cas le testicule. Plus on va dans le temps, plus les lésions palpables deviennent indurées, jusqu'à une sclérose complète du testicule avec atrophie.

Le développement de ces symptômes s'accompagne d'une diminution progressive du pouvoir fécondant du sperme, pouvant aller jusqu'à la stérilité complète dans le cas d'atteinte profonde bilatérale.

Cette orchi-épididymite est le plus souvent unilatérale, mais les cas d'atteintes bilatérales ne sont pas rares, avec leurs conséquences dramatiques sur la fertilité du bélier atteint.

Selon BAKURDJIEV (4), l'infection naturelle des béliers augmente de 6 p.100 le nombre de brebis non gestantes après une période de lutte. On imagine donc les pertes subies dans les pays d'enzootie comme l'Australie ou la Nouvelle Zélande.

b - Chez la femelle

Le rôle pathogène de Brucella ovis chez la brebis est très discuté. Si de nombreux auteurs incriminent directement le germe lors d'avortements tardifs, on n'a jamais pu en France incriminer ce germe avec certitude lors d'un avortement.

D'après HOERLEIN (59), MORELLO et coll. (86), OSBURN et KENNEDY (96), Brucella ovis ne peut se multiplier dans l'utérus qu'à condition qu'il soit gravide. Il y détermine des lésions de placentite qui peuvent alors provoquer un avortement tardif. (MEINERSHAGEN) (81). Selon Mc GOWAN (50), il faudrait un temps d'action de trois à quatre mois à Brucella ovis pour tuer le foetus.

Des avortements, probablement dûs à Brucella ovis, ont été signalés en Hongrie par KADAR et BANFALVI (65) après un diagnostic bactériologique et sérologique sur 24 brebis et leurs avortons.

On voit donc que, s'il est très net chez le mâle, le rôle pathogène de Brucella ovis chez la femelle est très limité.

Le diagnostic clinique n'aura donc lieu que chez le mâle. Cette forme de diagnostic possède d'ardents défenseurs comme HICKS et coll. (58), mais la très large majorité des auteurs s'accordent pour dénoncer son insuffisance. Ce diagnostic est en effet basé sur la palpation des testicules; or, il faut une très grande habitude pour détecter les épididymites infra-cliniques ou en début d'évolution, et de toute façon cette palpation ne détectera jamais les simples porteurs. Nous voyons donc que si ce diagnostic est fiable en cas d'épididymite nettement déclarée, il ne peut en aucun cas être le seul à la base d'une prophylaxie bien conduite. Il ne sera donc que partie prenante du diagnostic global de la maladie, complété par des méthodes expérimentales que nous envisagerons plus loin.

5 - LESIONS

a - Chez le mâle

Macroscopiques

On observe à divers degrés une augmentation de volume de la queue de l'épididyme qui peut atteindre jusqu'à cinq fois son volume normal. A un stade plus avancé, on note une hypertrophie du corps et de la tête de l'épididyme avec atrophie du testicule. La queue de l'épididyme hypertrophiée devient ferme et sa résistance à la coupe augmente. La surface de coupe est blanche par prolifération du tissu conjonctif. L'albuginée est souvent fibrosée et adhérente à la tunique vaginale et au testicule.

Dans de nombreux cas, un ou plusieurs spermatocoèles remplis d'une substance crémeuse ou plus tard caséeuse sont trouvés dans le tissu conjonctif. La rupture d'un de ces spermatocoèles peut provoquer l'oblitération de la cavité vaginale par des adhérences.

Les tubules des portions proximales hypertrophiées de l'épididyme sont dilatés et contiennent une très grande quantité de liquide. Rarement, on trouve des granulomes spermatiques au niveau de la tête de l'épididyme.

Microscopiques

+ Microscope optique

Au début, les lésions sont confinées au niveau de la queue de l'épididyme et consistent en un oedème périvasculaire avec infiltration lymphocytaire (KENNEDY et coll.) (68). Les capillaires sous la membrane

basale de l'épithélium tubulaire et dans la musculaire sont dégénérés. Dans ces zones, il y a un oedème périvasculaire avec infiltration de cellules sanguines. Plus tard, on peut observer des plages d'hyperplasie et de métaplasie épithéliale. L'endothélium capillaire prolifère. L'infiltration de l'épithélium augmente et des cellules inflammatoires se retrouvent dans la lumière des tubules. Des kystes peuvent se former dans l'épithélium. A un stade plus avancé, la lumière des tubules est obstruée et une fibrose se développe. Des spermatocoèles apparaissent et se transforment parfois en granulomes spermatiques. Les corps bactériens sont difficilement mis en évidence dans les coupes histologiques, d'après NIEBERLE et COHRS (93).

+ Microscope électronique

BAKURDJIEV et KRUSTEV (6) (7) ont réalisé des études très poussées sur les lésions d'épididymite contagieuse en microscopie électronique. Ils ont remarqué des perturbations de la structure normale des noyaux des spermatogonies et spermatocytes, avec vacuolisation du noyau et du cytoplasme, rupture de noyaux et de membranes cellulaires et décapitation des spermatides. L'épididyme présente une dégénérescence de le membrane basale et des hémorragies. Des corps bactériens ont été retrouvés dans la lumière du canal épididymaire.

Ces auteurs ont observé par ailleurs un phénomène d'autophagocytose des spermatozoïdes, particulièrement au niveau des pseudopodes des leucocytes. Ils ont aussi noté une pénétration active des spermatozoïdes dans les leucocytes. Parfois, le spermatozoïde phagocyté reste intact. Mais le plus souvent, une lyse de la plasmalemme est observée.

b - Chez la femelle

Macroscopiques

Les lésions ne sont observées que sur des placentas de brebis infectées en début de gestation. Elles sont caractérisées par un exsudat abondant, jaunâtre et persistant dans les zones intercotylédonnaires. On peut mettre en évidence de petits hématomes dans ces zones.

Microscopiques

Au niveau des zones infiltrées, on remarque une diffusion de lymphocytes en région périvasculaire. On peut aussi noter une nécrose en plage. Une nécrose focalisée du chorion a été observée par MORELLO et coll. (86).

Il est à remarquer que ces lésions ont été décrites la plupart du temps une inoculation expérimentale de Brucella ovis aux brebis. Dans le cas d'infection naturelle lors du coït, on n'observe aucune lésion placentaire à la mise bas qui suit.

c - Chez le foetus

OSBURN et KENNEDY (96) ayant pu provoquer des avortements par inoculation intra-utérine de Brucella ovis chez des femelles gestantes ont pu noter chez l'avorton des lésions essentiellement au niveau des poumons et de l'intestin (oedèmes, foyers de nécrose et hémorragies). Ils ont remarqué par ailleurs un développement anormal du système réticulo-endothélial, mais cela ne peut être considéré comme spécifique puisque toute introduction d'antigène dans l'utérus gravide provoque ce type de réaction chez le foetus.

6 - TRAITEMENT

Lors de ses expériences, KUPPUSWAMY (72) a montré qu'il est possible de guérir bactériologiquement un bélier atteint d'épididymite contagieuse. Le traitement le plus efficace est représenté par une association de chlortétracycline (800 mg.) et de streptomycine (1 g.) administrée quotidiennement pendant 21 jours.

Mais ce traitement ne rétablira en aucun cas la fertilité du bélier, les lésions épididymaires n'étant pas réversibles. D'autre part, il ne garantit pas totalement l'élimination du phénomène de portage. Enfin, appliqué sur une grande échelle, il se révèlerait très onéreux.

Nous voyons donc que, s'il est capable d'enrayer l'évolution de la maladie au niveau de l'individu, un tel traitement se révèle inutile face au problème de la pathologie de groupe.

7 - PROPHYLAXIE

a - Prophylaxie médicale

De très nombreuses méthodes de vaccination ont été proposées depuis la découverte de la maladie et de son agent étiologique. Se basant sur la parenté antigénique de Brucella ovis avec les autres espèces du genre, certains auteurs ont tenté d'immuniser les béliers avec les vaccins "Rev 1" ou "B 19". D'autres ont mis au point des vaccins spécifiques, ce qui a conduit à la mise sur le marché anglo-saxon de vaccins anti Brucella ovis.

Dès 1958, BUDDLE (18) prépare un vaccin Brucella ovis tué et adjuvé dont il compare l'efficacité utilisé seul ou en association avec le vaccin "B 19". Il constate la supériorité de l'association, confirmé en cela par CLAXTON (27) et Mc GOWAN (48). Mais de nombreux auteurs signalent une très forte réaction locale au niveau du point

d'injection du vaccin "B 19" avec une nécrose cutanée étendue. D'autre part, KATER et HARTLEY (66) constatent l'apparition d'abcès dans les cartilages épiphysaires des os longs, notamment ceux des membres postérieurs, abcès faisant suite à l'injection du vaccin "B 19". L'utilisation de ce produit est alors unanimement déconseillée chez le bélier.

D'autres auteurs, surtout sud-africains avec GRADWELL et Van ZYL (51), Van HEERDEN et Van RENSBURG (57), ont pour leur part immunisé les béliers à l'aide du vaccin "Rev 1". Ils ont ainsi obtenu d'excellents résultats, induisant une immunité solide, durable (trois ans au moins après deux injections par voie sous-cutanée) et efficace (remontée sensible du taux d'agnelage). Il est toutefois impossible d'appliquer cette méthode en France, puisqu'au terme de l'article 50 de l'arrêté ministériel du 23 Mars 1981, toute vaccination anti-brucellique de bélier est interdite (sauf dérogation exceptionnelle).

Enfin, des vaccins vivants "Brucella ovis" ont été préparés, notamment par BIBERSTEIN et coll. (10); il s'agit de vaccins atténués adsorbés sur alumine en excipient huileux. Ce produit est actuellement commercialisé aux Etats Unis sous le nom déposé de "RAMEDOL". Selon Mc GOWAN (47), ce vaccin injecté à raison de 5 ml par voie sous-cutanée en arrière de l'épaule deux fois à 5 - 6 semaines d'intervalle procure une bonne immunité aux jeunes béliers vaccinés à l'âge de 6 mois environ.

b - Prophylaxie sanitaire

Ce type de prophylaxie est fondé sur le dépistage le plus précoce possible de la maladie et l'élimination des animaux atteints. Comme nous le verrons plus loin, de nombreuses méthodes sont à notre disposition pour effectuer ce dépistage:

- Méthode clinique par palpation des testicules
- Méthode bactériologique par mise en culture d'échantillons

de sperme

- Méthodes sérologiques

Ainsi que nous l'avons fait remarquer auparavant, le diagnostic clinique, s'il permet une recherche facile et rapide des animaux malades, ne peut en aucun cas servir de base à un dépistage précoce de l'infection.

La méthode bactériologique, longue et parfois aléatoire comme nous l'avon fait remarquer précédemment, ne met en évidence que les béliers excréteurs de Brucella ovis, ce qui n'est pas le cas de tous les infectés latents.

Les méthodes sérologiques permettent quant à elles un dépistage plus précoce et plus sûr de l'intection par Brucella ovis. De nombreuses techniques ont été mises au point depuis que la maladie est étudiée, et à l'heure actuelle la technique de fixation du complément est recommandée par la majorité des auteurs. WEST et BRUERE (132) vont jusqu'à proposer d'en faire une condition sine qua non de l'agréement à l'exportation des béliers.

c - Conclusion: méthode d'éradication de la maladie

Compte tenu du taux d'infection enregistré dans les régions d'enzootie, l'éradication de l'épididymite contagieuse sera soit uniquement sanitaire, soit médico-sanitaire.

En région faiblement atteinte, il faudra, comme le montre RYAN (109), utiliser uniquement la prophylaxie sanitaire. Cet auteur a pu éliminer d'une île australienne l'infection à Brucella ovis en effectuant des fixations du complément tous les mois avec élimination systématique des béliers réagissants. Cette méthode est valable surtout hors période de lutte où les béliers ne peuvent plus se contaminer qu'entre eux. En utilisant ce procédé, BASHKATOV et AFANAS'EV (8) ont pu aboutir à l'éradication totale de la maladie dans leur région, faisant économiser

44 fois plus qu'ils n'ont dépensé.

Par contre, il faudra pratiquer une prophylaxie médico-sanitaire en région fortement atteinte. Toujours en se fondant sur les résultats de la fixation du complément, on procèdera à l'élimination des béliers réagissants, que l'on remplacera par de jeunes béliers préalablement vaccinés à l'âge de 6 mois. Par cette méthode, on évitera une dissémination trop importante de l'infection que l'on contiendra dans des limites acceptables pour la fertilité du troupeau.

KOVACS (71) a par ailleurs fait remarquer que les béliers vasectomisés utilisés pour la détection des chaleurs excrètent Brucella ovis dans leurs sécrétions préputiales. Cet auteur propose donc, pour éviter de propager la maladie, d'utiliser dans ce cas des béliers ayant subi une opération chirurgicale visant à dévier le pénis de son axe normal.

8 - LEGISLATION

La législation française s'est assez peu préoccupée du problème de l'épididymite contagieuse du bélier, étant donné sa découverte assez récente dans notre pays. Elle n'est pas inscrite sur la liste des maladies légalement contagieuses. Le législateur a toutefois réglementé l'accès à la monte publique et l'insémination artificielle en tenant compte de cette maladie respectivement par les arrêtés des 11 Février 1976 et 24 Avril 1974 qui imposent une mise en culture négative du sperme des béliers utilisés.

B - DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL

Compte tenu de l'insuffisance du diagnostic clinique, de nombreux auteurs ont mis au point un large éventail de techniques pour détecter l'infection à Brucella ovis le plus précocément possible.

On peut classer ces techniques en trois catégories: méthodes bactériologique, allergique et sérologiques. Une comparaison rigoureuse de ces techniques s'impose, puisque c'est d'elles que dépendra la qualité de la prophylaxie mise en oeuvre.

1 - DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

Cette méthode repose sur la mise en évidence de Brucella ovis par culture sur milieux spéciaux et identification par une galerie de tests biochimiques

a - Prélèvements

La recherche s'effectue sur des échantillons de sperme prélevés par électro-éjaculation. On peut également analyser les sécrétions préputiales qui, selon KOVACS (71), contiennent une grande quantité de germes.

b - Isolement

Il s'effectue sur milieu de Thayer-Martin modifié par l'adjonction de nitrofurantoïne. La culture demande environ 5 à 6 jours d'incubation à 37 degrés Celsius sous tension en CO2 de 5 à 10 p.100.

c - Identification

L'identification du germe repose sur l'observation de la morphologie des colonies, et sur un ensemble de test biochimiques décrits en détail par ALTON et coll. (2). Nous retiendrons une galerie simplifiée fondée sur la recherche d'une oxydase, d'une uréase, d'une réduction des nitrates et de l'oxydation du glucose et de l'érythritol.

Si elle permet un diagnostic de certitude lorsqu'elle est positive, cette méthode s'avère insuffisante pour le dépistage de la maladie. En effet, de nombreux béliers infectés, notamment ceux ne portant pas de lésions décelables à la palpation, excrètent le germe avec de fréquentes phases d'éclipse. On ne peut donc pas se fonder sur cette méthode pour éliminer les béliers infectés au cours d'une prophylaxie.

Par contre, les techniques bactériologiques sont d'un grand secours lors du diagnostic différentiel des épididymites cliniquement déclarées. De LONG et coll. (76), ZAMOR et coll. (134) ont en effet montré que si Brucella ovis représente l'étiologie la plus fréquente de ces troubles, de nombreux autres germes en sont capables à un degré moindre, principalement Actinobacillus seminis, Corynebacterium pseudotuberculosis et Corynebacterium pyogenes.

En conclusion, le diagnostic bactériologique n'est pas recommandé pour le dépistage de la maladie, mais il se révèle fort utile au niveau de la pathologie individuelle.

2 - DIAGNOSTIC ALLERGIQUE

Dès 1955, HALL (53) décrit une méthode allergique pour dépister les béliers infectés par Brucella ovis. Pour cela, il injecte un antigène (suspension de Brucella ovis formolée) par voie intra-dermique en arrière de l'épaule après avoir tondu les poils. La lecture de ce test

se fait trois à quatre jours plus tard par mensuration du pli cutané. La réaction n'est jamais aussi nette que lors par exemple d'une tuberculination chez les bovins, et HALL considère comme significative une augmentation de l'épaisseur du pli d'au moins 1,5 cm. Cette technique a été reprise par plusieurs auteurs dont IONESCU (63) qui a trouvé des résultats similaires à ceux de HALL, c'est à dire une bonne sensibilité du test.

JONES et coll. (64) ont quant à eux expérimenté la mellitine par voie intra-dermique dans la paupière, utilisant ainsi la parenté antigénique (cf Fig. 1) entre Brucella ovis et Brucella melitensis. Ils ont eux aussi obtenu de bons résultats pour le dépistage de groupe, mais ils reprochent à cette technique le manque de corrélation entre la réaction obtenue et le degré d'infection des animaux.

Le gros problème de cette méthode de diagnostic est l'hostilité des éleveurs constatée lors des expériences de dépistage sur une grande échelle. Elle leur impose en effet deux manipulations de leurs animaux et ils préfèrent nettement une seule visite du vétérinaire ou du technicien pour faire une prise de sang. D'autre part, le léger manque de sensibilité de ce test l'a fait négliger dans la plupart des épreuves comparatives de diagnostic, ce qui fait que les données sur cette technique sont restées très fragmentaires.

3 - DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

Un très grand nombre de tests sérologiques ont été proposés. Nous avons actuellement à notre disposition la fixation du complément, la précipitation en gélose, l'hémagglutination indirecte, l'immunofluorescence indirecte et la contre-immunoélectrophorèse. La séroagglutination a été testée dans les années 1950, mais les difficultés rencontrées dans la préparation des antigènes ainsi que l'instabilité de ces antigènes ont fait rapidement abandonner cette méthode.

Nous nous proposons de présenter ces différentes techniques

utilisables, puis de critiquer leurs qualités respectives.

a - Eventail des techniques.

+ Test de diffusion en gélose

Ce test a souvent été développé: COX et coll. (28), JONES et coll. (64), MATTHEWS et TRUEBLOOD (80), MUNCZ et KORMENDY (88), MYERS (90) l'ont tous utilisé en comparaison avec le test de fixation du complément.

L'antigène utilisé a d'abord été un antigène total, puis un antigène extrait par ultra-sons et enfin un antigène soluble extrait par la chaleur. C'est ce dernier qui permet d'obtenir les meilleurs résultats, les premiers donnant des réactions croisées importantes avec les autres Brucella.

La technique est fondée sur la méthode d'Ouchterlony. L'antigène non dilué est déposé dans une cupule centrale, les sérums dans les cupules périphériques. La lecture se fait après 24 à 48 heures d'incubation à 37 degrés Celsius par observation des arcs de précipitation entre les sérums et l'antigène.

+ Test d'hémagglutination indirecte

Décrit pour la première fois par RIS et TE PUNGA (106), ce test a été repris en 1980 par WEBB et coll. (129). Ce sont les deux seuls auteurs à ce jour à avoir développé cette technique.

Une suspension à 4 p.100 d'hématies de mouton lavées est tannée par un volume égal d'acide tannique à 0,007 p.100 en tampon P.B.S. à pH 7,6 pendant 30 minutes à 37 degrés Celsius. La solution résultante à 2 p.100 d'hématies est alors mise en présence du même volume d'une dilution optimale d'un antigène Brucella ovis soluble pendant 45 minutes

à 37 degrés Celsius. Les hématies ainsi sensibilisées sont lavées deux fois dans su tampon P.B.S. contenant 0,5 p.100 de sérum de lapin et remises en solution dans ce même tampon jusqu'à une dilution finale de 1 p.100.

Ces hématies sensibilisées sont alors ajoutées à raison de 25 microlitres dans les cupules d'une microplaque contenant les dilutions sériées des sérums testés.

La lecture se fait en repérant la dernière cupule où la dilution du sérum permet encore une hémagglutination complète après une incubation de deux heures à la température du laboratoire.

+ Contre-immunoélectrophorèse

Ce test utilise le même antigène que la diffusion en gélose, c'est à dire un antigène soluble extrait par la chaleur. La méthode a été mise au point principalement par MYERS et VARELA-DIAZ (91).

Des lames sont recouvertes d'une fine couche de gélose et mises à sécher dans des boites de Petri pendant 10 minutes à 4 degrés Celsius. On dessine alors des cupules de 3 mm de diamètre sur deux rangées distantes de 10 mm, de telle sorte que chaque cupule soit distante de sa voisine de 6 mm. Les cupules sont alors évidées du côté anodique de la lame et les sérums y sont ajoutés. On commence l'électrophorèse pendant 30 minutes en appliquant une différence de potentiel de 10 V. entre les extrémités de la lame. Puis les cupules du côté anodique sont évidées à leur tour et remplies d'antigène. L'électrophorèse est alors poursuivie sous le même voltage pendant 90 minutes. Le refroidissement de la gélose est assuré en maintenant un courant permanent de tampon et en humidifiant périodiquement le papier filtre de contact avec ce même tampon.

Le résultat de ce test est apprécié par observation des arcs de précipitation qui apparaissent entre les sérums et l'antigène.

+ Test d'immunofluorescence indirecte

Cette technique emploie un antigène bactérien facile à obtenir. Il suffit de mettre en suspension dans du tampon à pH 7,2 des colonies de Brucella ovis que l'on tue par un agent chimique (phénol pa exemple) et qu'on lave par trois centrifugations successives. La méthode a été développée par COX et coll. (28) en 1977. L'antigène est étalé sur une lame de façon à obtenir un film bactérien fin et régulier, que l'on recouvre de différentes dilutions de sérum. Après lavages dans un tampon I.F., on dispose la globuline de lapin anti-mouton marquée à l'isothiocyannate de fluorescéine, en la laissant agir 30 minutes.

La lecture s'effectue grâce à un microscope spécial à fluorescence. Le titre du sérum positif est donné par la dernière dilution présentant une fluorescence supérieure à celle enregistrée avec un sérum témoin négatif non dilué.

+ Réaction de fixation du complément

C'est de très loin la méthode la plus étudiée et la plus utilisée dans le monde.

Dès 1955, CLAPP (24) met au point une technique en tubes. Mais, comme tous ses confrères travaillant sur le même sujet, il se heurte au problème du fort pouvoir anticomplémentaire des antigènes préparés à cette époque. On utilisait alors des corps bactériens totaux.

En 1958, BIBERSTEIN et Mc GOWAN (9) emploient une technique différente pour fabriquer leur antigène qu'ils extraient par ultra-sons. La préparation ainsi obtenue ne contient pratiquement plus d'éléments cellulaires et perd la quasi-totalité de son pouvoir anti-complémentaire.

Actuellement, la majorité des auteurs utilise un antigène soluble extrait par la chaleur, celui-là même qui est utilisé pour la diffusion en gélose et la contre-immunoélectrophorèse. En effet, MYERS (90)

a montré que les antigènes extraits par ultra-sons induisent des réactions croisées avec les autres Brucella, alors que l'extraction par la chaleur ne révèle que des antigènes de surface, donc dans ce cas spécifiques des Brucella en phase R (Brucella ovis et Brucella canis). Jusqu'à une époque assez récente, la réaction était réalisée en macrométhode, ce qui faisait employer de grandes quantités de réactifs.

En 1975, SANCHIS et GIAUFFRET (111) mettent au point une réaction en microméthode qui est maintenant très utilisée. Cette technique permet une économie importante de réactifs, une application plus aisée au diagnostic en grandes séries et la possibilité d'une automatisation du test.

Après titrage, le complément est utilisé sous deux unités hémolytiques 100 p.100. Le dépistage de routine est effectué uniquement sur les dilutions au dixième des sérums, les dilutions en série n'étant étudiées qu'en cas d'enquête épidémiologique poussée. Les auteurs utilisent une méthode à chaud: après répartition du tampon véronal, des dilutions du sérum et distribution de l'antigène et du complément, la microplaque est mise à l'étuve à 37 degrés Celsius pendant 30 minutes. Le système hémolytique est alors réparti dans les cupules et les plaques replacées dans l'étuve pendant 30 minutes avec agitation toutes les 10 minutes. Pour une lecture plus aisée, les plaques subissent une centrifugation douce pendant 2 minutes au sortir de l'étuve.

La lecture, effectuée soit directement, soit à l'aide d'un miroir spécial, consiste à rechercher la première cupule où la dilution du sérum est telle qu'on observe une hémolyse totale.

b - Etude critique

+ Diffusion en gélose

Les auteurs ayant étudié cette technique l'ont toujours comparée à la fixation du complément. Pour certains d'entre eux (MATTHEWS,

MYERS), elles donnent des résultats comparables, et la diffusion en gélose est alors préférée en raison de sa plus grande facilité de mise en oeuvre par rapport à la fixation du complément.

Mais la majorité des publications rendant compte de cette technique, si elles ne contestent pas son aspect pratique, lui reprochent un nombre trop élevé de réactions faussement négatives, notamment par rapport à la fixation du complément et à l'immunofluorescence indirecte. Par ailleurs, il est souvent mentionné les quantités trop importantes d'antigène que nécessite ce test.

Nous pouvons donc dire, au vu des publications les plus récentes, que le diagnostic de l'épididymite contagieuse pratiqué par diffusion en gélose est une source d'erreurs non négligeable et que cette technique n'est donc pas recommandable pour le dépistage de la maladie.

+ Hémagglutination indirecte

Cette méthode de diagnostic a été très peu décrite pour l'épididymite contagieuse. Les données comparatives sont donc très insuffisantes. Les résultats paraissant très encourageants d'après RIS et WEBB (grande spécificité, bonne sensibilité), cette technique pourrait être envisagée pour effectuer le dépistage de la maladie. Mais nous pensons qu'il faut attendre de plus amples renseignements pour pouvoir se faire une opinion réellement objective sur la valeur de ce test.

+ Contre-immunoélectrophorèse

Cette méthode de diagnostic, dérivée de la diffusion en gélose pour la rendre plus rapide, n'a été étudiée que dans deux publications. MYERS rend compte de résultats très prometteurs lors de son expérimentation, la réaction présentant une bonne spécificité. Mais il parait peu probable que cette technique trouve un jour une application sur

une grande échelle, aussi fiable soit elle. Elle nécéssite en effet de trop grands moyens techniques et ne permet pas de traiter beaucoup de sérums simultanément. Elle pourrait par contre se révéler utile dans le diagnostic de l'infection au niveau individuel.

+ Immunofluorescence indirecte

Jusqu'à ce jour, seul COX a développé cette technique. D'après cet auteur, c'est une méthode simple à mettre en oeuvre et utilisable pour le diagnostic courant. Elle se révèle au moins aussi sensible que la fixation du complément. Le seul problème est la nécessité de disposer d'un microscope à fluorescence.

Nous discuterons en détails de la valeur de cette technique au vu de nos propres résultats dans la troisième partie de ce travail.

+ Fixation du complément

C'est la technique la plus largement utilisée à l'heure actuelle et, à ce titre, celle dont on peut le mieux mesurer la valeur. Elle est la plus fiable des méthodes que l'on ait tenté d'utiliser sur une grande échelle jusqu'à présent. C'est ce qui la fait utiliser comme test de référence dans tous les essais comparatifs étudiant les diverses méthodes de dépistage de l'épididymite.

Cette technique est unanimement reconnue comme assez sensible, son défaut étant de ne pas déceler précocément les anticorps. D'autre part, cette technique est bien au point depuis l'apparition des antigènes solubles extraits par la chaleur. Enfin, les travaux de SANCHIS et GIAUFFRET (111) ont permis de l'appliquer facilement au dépistage systématique de la maladie, avantage important par rapport à la diffusion en gélose ou à la contre-immunoélectrophorèse.

Mais plusieurs travaux récents, notamment ceux de WEBB (129)

comparant les diverses méthodes disponibles pour le diagnostic de l'épididymite contagieuse lui reprochent d'être très lourde à mettre en oeuvre, même en microméthode.

D'autre part, plusieurs auteurs effectuant des inoculations expérimentales ont montré, en dehors de la lenteur à se positiver par rapport à certaines autres tecniques (principalement l'immunofluorescence indirecte), un nombre non négligeable de fausses positivités.

Enfin, dans le cadre d'une prophylaxie collective, cette réaction est toujours en butte face au problème du pouvoir anticomplémentaire d'un nombre important de sérums.

En conclusion, il faut admettre que la fixation du complément, largement répandue à l'heure actuelle, est d'une assez bonne fiabilité. Elle est donc actuellement conseillée pour le dépistage systématique de l'épididymite contagieuse des béliers. Toutefois, il ne faut pas négliger les promesses des techniques récentes (hémagglutination indirecte, immunofluorescence indirecte et surtout E.L.I.S.A.) et tenter de mettre au point celles-ci pour pouvoir disposer d'un diagnostic sûr et rapide de cette maladie.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

MISE AU POINT DES TEST E.L.I.S.A. ET I.F.I.

ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE DANS LES HAUTES PYRENEES.

I . MISE AU POINT DES TESTS E.L.I.S.A. ET I.F.I. COMPARAISON AVEC LA FIXATION DU COMPLEMENT.

A - MATERIEL ET METHODES

1 - La fixation du complément

Etant donnée son universalité, nous avons choisi ce test comme référence dans cette expérimentation. La technique utilisée est une réaction en microméthode à chaud de type Kolmer.

Il ne parait pas utile de revenir sur le principe , ainsi que sur l'aspect technique de cette méthode désormais classique, la considérant bien connue de tous.

Il convient toutefois d'insister sur le fait que nous avons utilisé le complément à la concentration finale de 3 unités hémolytiques 50 p.100 (3 UH50), soit deux fois moins que les 2 UH100 ou les 6 UH50 généralement employées pour les réactions de fixation du complément, quel que soit le système antigène-anticorps. En effet, en réalisant des fixations du complément sur un lot de sérums avec soit 3, soit 4, soit 5, soit 6 UH50, nous avons pu constater que l'utilisation du complément à la concentration de 3 UH50 procure une meilleure sensibilité au test sans en altérer sa spécificité.(Contrôle effectué sur 24 sérums)

Les sérums analysés ont été envoyés par les divers laboratoires des Directions des Services Vétérinaires du Sud-Ouest, principalement ceux de Tarbes et de Toulouse.

L'antigène est celui de l'Institut Mérieux (IFFA); il s'agit d'un antigène soluble extrait par la chaleur, livré concentré 25 fois.

Le complément utilisé est du complément de cobaye fourni

par l'Institut Pasteur (IPP), ainsi que le sérum hémolytique de lapin anti-globules rouges de mouton. Les hématies de mouton à 50 p.100 sont commercialisées par Bio-Mérieux.

Toutes les dilutions sont faites en tampon Véronal. Le seuil de positivité est fixé à 50 p.100 d'inhibition de l'hémolyse à la dilution du 1/8.

2 - L'immunofluorescence indirecte (I.F.I.)

a - Matériel

+ L'antigène

Nous avons préparé notre antigène selon la technique de SAURAT et GANIERE (113). Partant de l'antigène Mérieux pour la séroagglutination Brucella ovis, on obtient une suspension de corps bactériens par trois lavages successifs (centrifugation avec remise en suspension en tampon P.B.S. à pH 7,2). La concentration finale de la suspension est ajustée à environ un milliard de germes par ml. par comparaison optique avec une suspension standard.

+ Les sérums

Nous avons choisi pour mettre au point les deux techniques (I.F.I. et E.L.I.S.A.) des sérums positifs parmi les 915 sérums de bélier reçus au laboratoire, afin de pouvoir comparer les méthodes de diagnostic.

+ Le conjugué fluorescent anti-globuline ovine

Nous utilisons un conjugué fourni par le laboratoire Wellcome. Il s'agit d'anticorps anti-IgG couplés à de l'isothiocyannate

de fluorescéine. La dilution d'utilisation est fixée au 1/30° par une série de tests détaillés dans le chapitre sensibilité. Ce conjugué, anti-chaines lourdes et légères d'IgG, reconnait toutes les classes d'immuno-globulines ovines.

+ Liquide de dilution

Toutes les dilutions et tous les lavages sont faits en tampon phosphate 0,01 M à pH 7,2, NaCl 0,15 M (Tampon P.B.S.).

+ Le microscope

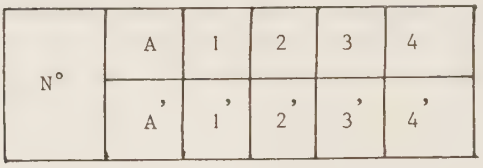
Nous utilisons un photomicroscope Carl Zeiss équipé pour la microscopie en fluorescence par une lampe Philips à vapeur de mercure H.B.O. 200 W. Les filtres d'excitation sont de référence BP 455-490, et ceux d'arrêt FT 510-LP520.

b - Méthode

+ Préparation des lames

Un étalement mince et homogène est effectué grâce à un écouvillon à partir de la suspension de Brucella ovis sur des lames ordinaires bien dégraissées et légèrement chauffées. Ces lames sont ensuite fixées dans l'alcool méthylique pendant 5 minutes. Puis on délimite des cases d'environ 1 centimètre carré à l'aide d'un crayon gras. Les lames ainsi préparées peuvent être conservées une dizaine de jours par congélation.

Figure 2. Schéma d'une lame d'immunofluorescence.



+ Disposition des sérums (cf. figure 2)

Chaque lame porte deux sérums. Les cases A et A' servent pour les témoins conjugué. Les cases 1,2,3,4 et 1',2',3',4' portent les dilutions sériées des sérums. Les dilutions utiles de 1/80, 1/160, 1/320 et 1/640 ont été déterminées lors de l'étude de sensibilité(cf. chapitre correspondant).

+ Déroulement de la réaction

Le sérum à étudier est placé à raison de 2 à 3 gouttes de concentrations de sérum progressivement croissantes, la zone "témoin conjugué" recevant 2 à 3 gouttes de tampon P.B.S. Les lames sont alors placées en chambre humide à 37 degrés Celsius pendant 30 minutes, puis lavées trois fois 5 minutes en tampon P.B.S. avec agitation magnétique.

Le conjugué est ensuite réparti sur la totalité des lames qui sont incubées 30 minutes à 37 degrés Celsius en chambre humide. Trois derniers lavages sont effectués comme précédemment.

Les lames ainsi obtenues sont examinées au microscope à fluorescence et l'on note l'intensité de la réaction selon une échelle: +, ++, +++ et ++++. Le grossissement utilisé est de 400.

c - Tests de spécificité et de sensibilité

+ Spécificité

Les tests ont été conduits de la façon suivante. Nous avons utilisé des sérums reconnus positifs et négatifs par les techniques classiques:

- soit pour Brucella ovis par la réaction de fixation du complément (R.F.C.).
- soit pour Brucella abortus ou melitensis par l'épreuve à l'antigène tamponné, par la séroagglutination de Wright et/ou par la R.F.C.

Ces sérums ont été testés vis à vis de divers antigènes en immunofluorescence:

- antigène Brucella ovis
- antigène Brucella abortus (préparé selon la technique de SAURAT)
- antigène Brucella en phase R (préparé à partir d'un vaccin 45/20 ABORTOX N.D.)
- antigène Parvobactérie (Pasteurella multocida)

Ces tests ont donné les résultats regroupés dans le tableau numéro 1.

Tableau n°1. Spécificité de l'I.F.I. (Sérums dilués au 1/80)

SERUMS / ANTIGENES	Positif B.ovis (13 sérums)	Positif B.abortus (8 sérums)	Négatif (8 sérums)
Brucella ovis	+++	–	–
Brucella abortus	–	+++	–
Brucella phase R	+++	++ à +/–	–
Parvobactérie	–	–	–

Au vu de ces résultats, on peut conclure:

- l'antigène B.ovis est spécifique pour l'I.F.I.
- il existe une communauté antigénique (révélée par l'antigène Brucella en phase R) entre B. ovis et B. abortus. Le passage de Brucella abortus en phase R révèle donc une structure antigénique partiellement portée par B. ovis (naturellement en phase R)

+ Sensibilité

Les tests de sensibilité ont eu deux buts:

- Déterminer la concentration optimale du conjugué
- Déterminer les dilutions utiles de sérum

- Dilution du conjugué

L'expérimentation menée avec diverses dilutions du conjugué face aux sérums ayant servi pour les tests de spécificité est résumée dans le tableau numéro 2.

Tableau n°2. Détermination de la concentration optimale de conjugué.

SERUMS / DILUTION DU CONJUGUE	Positif B.ovis (13 sérums)	Positif B.abortus (8 sérums)	Négatif (8 sérums)
1 / 20	+++	+/–	+/–
1 / 30	+++	–	–
1 / 40	+++ ou ++	–	–
1 / 50	++	–	–

Compte tenu de ces résultats, nous avons donc travaillé par la suite avec un conjugué dilué au 1/30, puisque c'est cette dilution qui permet d'obtenir la meilleure sensibilité sans faire perdre sa spécificité au test.

- Dilutions utiles des sérums

Ces dilutions ont été déterminées après avoir testé une quarantaine de sérums positifs ou négatifs par les techniques classiques vis à vis des deux antigènes. (B. ovis et B.abortus). Les résultats ont montré qu'aux faibles dilutions (1/20 et 1/40), une fluorescence non spécifique parfois importante est détectée. Aux fortes dilutions (1/640 et plus), la fluorescence est totalement éteinte (seuls 3 sérums sur les 200 testés lors de ce travail présentaient encore une légère fluorescence (+) au 1/640.

Nous avons donc choisi comme dilutions d'essai: 1/80, 1/160, 1/320 et 1/640. Le seuil de positivité est de ++ au 1/80.

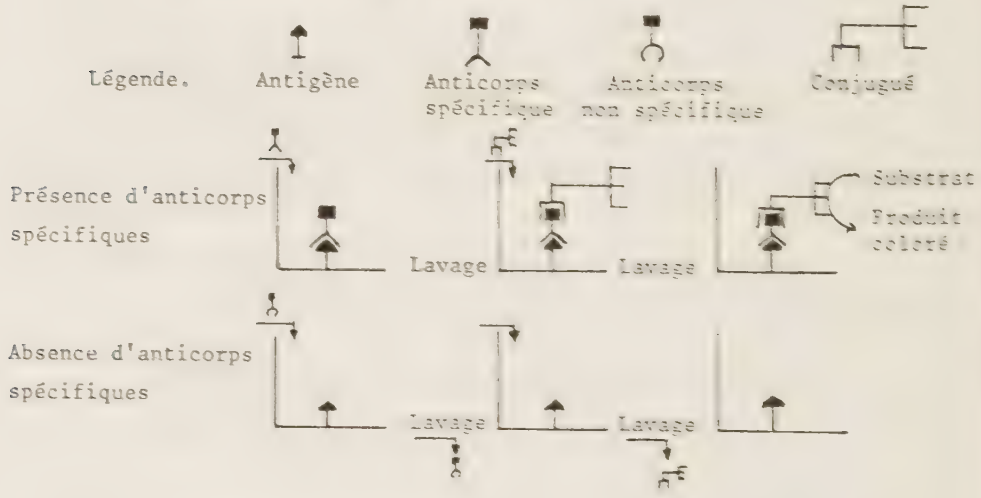
3 - Test immunoenzymatique E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorben Assay)

a - Rappel du principe (cf. Figure 3)

Le test E.L.I.S.A. est une méthode immunoenzymatique, fondée sur l'utilisation d'anticorps marqués par une enzyme. Dans notre cas, les antiglobulines de mouton utilisées sont couplées à la peroxydase de raifort. Cette enzyme a pour effet de dégrader un substrat en faisant apparaitre un produit coloré dont la concentration (donc la densité optique ou D.O. du liquide dans la cupule de réaction) est appréciée à l'oeil, ou mieux par spectrophotométrie.

Le principe de base est le même que celui de l'immunofluorescence indirecte: sur un antigène fixé à un support, on fait agir un sérum. Si celui-ci contient des anticorps, il y a formation d'immuncomplexes fixés, que l'on révèle en faisant agir une antiglobuline marquée par une enzyme. L'adjonction d'un substrat spécifique de cette enzyme permettant une réaction colorée met ensuite indirectement en évidence la présence d'anticorps dans le sérum suspect. (figure 3)

Figure n° 3. Principe de l'E.L.I.S.A.



b - Matériel et réactifs

+ Matériel

Le support

Le test E.L.I.S.A. nécessite un support spécial permettant la fixation de l'antigène. Nous employons des microplaques à 96 cupules

"Micro-Elisa" en immulon à fond plat référence M 129 B qui, d'après PELLERIN et coll. (97) donnent les meilleurs résultats.

L'appareil de lavage

Tous les lavages entre chaque répartition de réactif sont réalisés avec un appareil spécial: le Microwash (DYNATECH).

L'appareil de lecture

La lecture est réalisée à l'aide d'un appareil multicanaux effectuant une mesure automatique des densités optiques (D.O.) directement au travers du fond plat de chaque cupule, et imprimant les résultats. Il s'agit du TITERTEK MULTISKAN équipé (pour le substrat que nous utilisons) d'un filtre de 580 nm.

+ Réactifs

L'antigène

L'antigène est préparé selon la technique de THOEN (120) à partir d'une souche de Brucella ovis (fournie dans notre travail par l'Institut Mérieux). On inocule 10 ml de bouillon tryptose que l'on incube à 37 degrés Celsius pendant 72 heures. 5 ml de ce bouillon servent alors à inoculer des flacons de Roux incubés 4 jours à 37 degrés Celsius sous une tension en CO2 égale à 10 p.100. La gélose utilisée est une gélose Columbia.

Les bactéries sont ensuite récupérées en lavant la surface de la gélose avec du tampon P.B.S., puis autoclavées 15 minutes à 121 degrés Celsius, et enfin lavées 2 fois en P.B.S. par centrifugation.

La concentration de l'antigène est ajustée grâce à une échelle de Mc Farland (M.F.).

Les serums

Les serums testés sont les mêmes que ceux employés pour l'I.F.I. Les dilutions sont réalisées rapidement grâce à un diluteur automatique (Compu-Pet).

Le conjugué

Nous avons utilisé pour ce travail un serum de lapin anti-immunoglobulines ovines (IgG. H + L), couplé à la péroxydase de raifort par le glutaraldéhyde, commercialisé par l'Institut Pasteur.

Le substrat

A chaque marqueur enzymatique peuvent convenir plusieurs substrats. Pour la peroxydase de raifort, nous avons choisi l'orthotolidine qui semble donner, d'après MONGET (85), les meilleurs résultats.

Ce substrat a pour formule:

- Orthotolidine (SIGMA) ---------- 21,2 mg.
- N - N diméthylformamide (MERCK) ------ 1 ml.
- Eau oxygénée 30 volumes ---------- 40 microlitres.
- Tampon de Mc Ilvaine ---------- q.s.p. 100 ml.

Il est à noter que l'utilisation de ce substrat, potentiellement cancérigène, suppose d'importantes précautions dans la manipulation et le nettoyage de la verrerie.

Les tampons

Trois sortes de tampons sont utilisés:

- Tampon pour la dilution des réactifs
- Tampon pour le liquide de lavage
- Tampon pour la dilution du substrat

Le tampon utilisé pour diluer les réactifs est une solution hypersalée (NaCl 0,5 M) tamponnée à pH 7,4 (par K2HPO4 1 M). Le problème posé par la fixation non spécifique des divers réactifs sur le support est résolu par l'adjonction à la solution de dilution de 1 p.100 de Tween 80 (Agent tensioactif).

La même solution hypersalée est utilisée pour le lavage des cupules entre chaque réactif, mais le Tween 80 y est ajouté à une concentration inférieure (0,5 p.100).

Le liquide de dilution du substrat est le tampon de Mc Ilvaine (tampon citrate 0,1 M - phosphate 0,2 M à pH 4).

c - Méthode

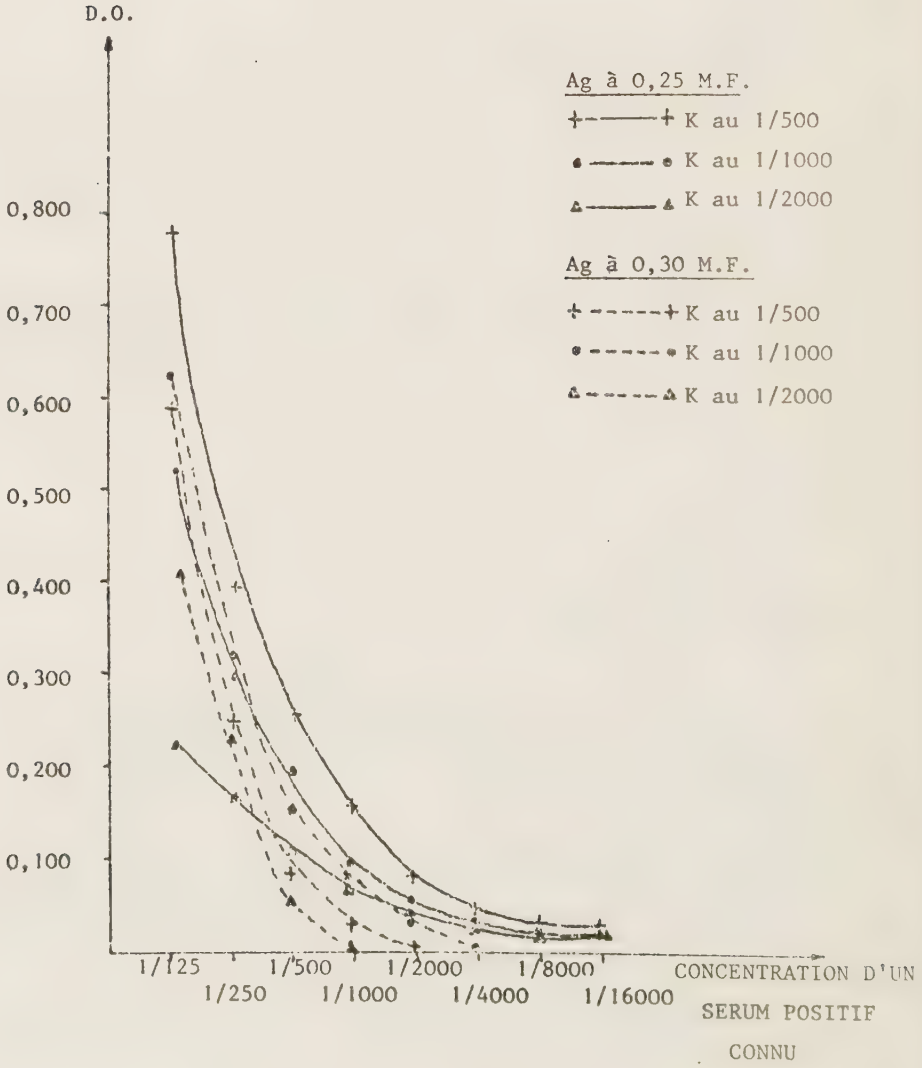
+ Tests de sensibilité

Ces tests ont eu pour but de déterminer les concentrations utiles d'antigène, de serum et de conjugué. Des tests ont donc été réalisés par la méthode de l'échiquier en faisant varier chacun des paramètres deux à deux.

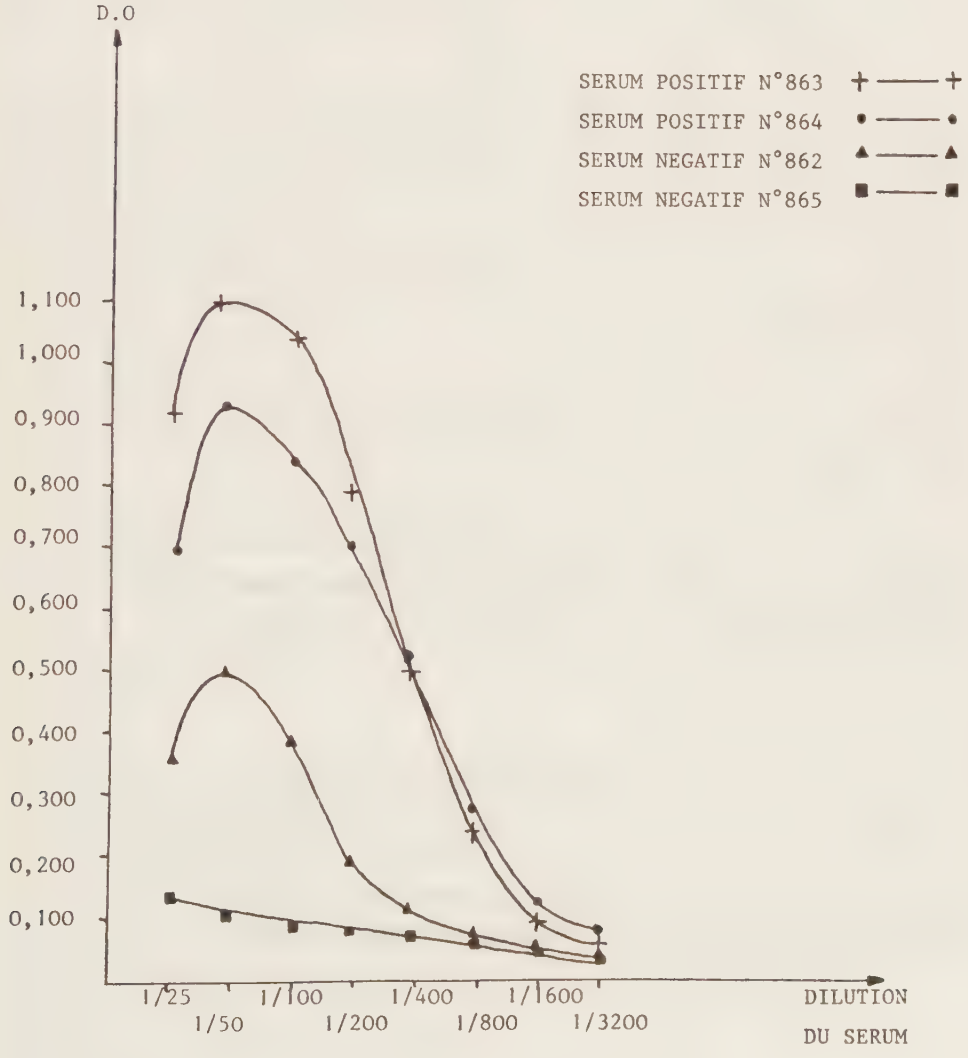
La détermination des concentrations en antigène et en conjugué a été réalisée grâce à l'expérience rapportée dans le graphique numéro 1. Notre choix s'est alors porté sur les cocentrations suivantes:

- Antigène ajusté à 0,25 M.F. C'est en effet la plus petite conxentration qui permet encore d'obtenir des D.O. élevées. Pour 0,30 M.F., les D.O. deviennent trop faibles pour pouvoir

GRAPHIQUE N° 1 . DETERMINATION DES CONCENTRATIONS UTILES D'ANTIGENE ET DE CONJUGUE



GRAPHIQUE N° 2 . DETERMINATION DE LA CONCENTRATION UTILE DES SERUMS



bien séparer les serums positifs et négatifs.

- Conjugué dilué au 1/1000. Cette dilution permet encore d'obtenir des D.O. assez élevées. Une concentration supérieure (1/500), comme nous le voyons plus loin, donne des D.O. plus élevées, mais altère la spécificité du test.

La dilution utile de serum a été déterminée en testant plusieurs serums, positifs et négatifs par la fixation du complément. Le but de cette expérimentation est la recherche du plateau théorique formé par les valeurs des D.O. correspondant aux faibles dilutions des serums, ainsi que la plus forte dilution de serum pour laquelle la D.O. est encore au plateau. Cette expérimentation est résumée dans le graphique numéro 2.

En réalité, nous n'avons jamais pu obtenir ce plateau théorique, mais un pic de D.O. toujours situé au niveau des dilutions 1/50 - 1/100.

Nous avons choisi comme dilution d'essai celle du 1/200. C'est en effet celle qui, ne donnant plus la D.O. maximale, permet d'abaisser suffisamment la D.O. des serums négatifs pour assurer une bonne discrimination entre les serums positifs et négatifs.

+ Tests de spécificité

Nous avons testé plusieurs serums positifs, soit vis à vis de Brucella ovis par la R.F.C., soit vis à vis de Brucella abortus par la R.F.C. ou l'E.A.T., sur deux types d'antigène (Brucella ovis et Brucella abortus). Les serums sont testés à la dilution du 1/200. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau numéro 3.

Tableau n° 3. Spécificité du test E.L.I.S.A.
(K = Conjugué)

Antigène / Serum au 1/200	Antigène Brucella ovis		Antigène Brucella abortus	
	K = 1/500	K = 1/1000	K = 1/500	K = 1/1000
Positif B.ovis (5 serums)	+++	+++	+++	+++
Positif B.abortus (8 serums)	+/-	-	+++	+++
Négatif (3 serums)	+/-	-	++ à +/-	++ à +/-

N . B . Il n'a pas été dans notre propos de mettre au point la méthode E.L.I.S.A. pour la détection de la brucellose abortive des ovins. C'est pourquoi nous ne pouvons donner de précisions chiffrées sur les D.O. comparées d'un serum positif par rapport aux deux antigènes (nous avons en effet testé les serums au 1/200, alors qu'il semble que le test E.L.I.S.A. utilisant l'antigène Brucella abortus nécéssite des serums dilués au moins au 1/400.

Le tableau n°3 nous permet de tirer deux enseignements:

- D'une part, il apporte une justification au choix du 1/1000 comme titre de dilution du conjugué
- D'autre part, il faudra tenir compte de la positivité des serums Brucella ovis sur l'antigène Brucella abortus lors de la mise au point du test E.L.I.S.A. pour la brucellose

abortive des ovins. Ce serait dans ce cas une fausse positivité par réaction croisée.

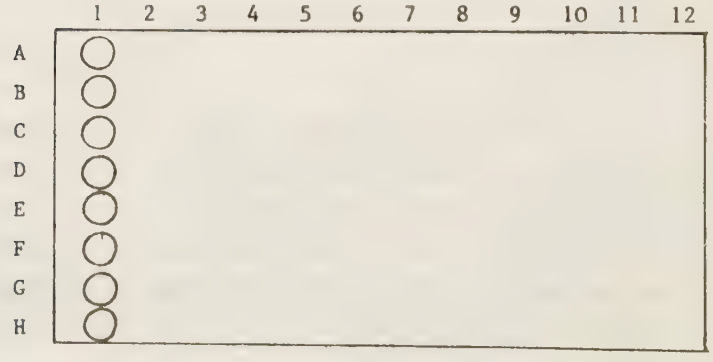
Ces relations antigéniques nous ont donc conduit à tester tous les serums vis à vis des deux antigènes, avec le système suivant pour l'expression des résultats:

Antigène B.ovis	Antigène B.abortus	Nature du serum
+++	++++	Positif B.ovis
-	++++	Positif B.abortus
-	++/-	Négatif

+ Mode opératoire

N.B. Une microplaque E.L.I.S.A. comprend 8 lignes (A à H) et 12 colonnes (1 à 12) (cf. Fig.4)
Chaque dilution de serum est testée en double. La D.O. retenue est la valeur moyenne des deux D.O. obtenues.

Figure 4. Schéma d'une microplaque E.L.I.S.A.



Fixation de l'antigène

Pour fixer l'antigène sur le fond et les parois des cupules, il suffit de laisser en contact 100 microlitres de la solution antigénique ajustée à 0,25 M.F. dans ces cupules pendant 16 à 18 heures à la température ambiante (20 degrés Celsius environ).

L'antigène Brucella ovis est réparti dans les cupules des lignes A, B, E et F. L'antigène Brucella abortus dans celles des lignes C, D, G et H.

Après le temps de contact, chaque cupule est lavée trois fois à l'aide du Microwash.

Disposition des serums

Les cupules d'une demi-colonne recoivent chacune 100 microlitres d'une dilution au 1/200 d'un serum.

La demi-colonne 11A reçoit le serum témoin positif Brucella ovis, la 11E le serum témoin positif Brucella abortus, la 12A sert de témoin conjugué (pas de serum) et la 12E reçoit le serum témoin négatif.

La plaque où l'on a réparti les serums est alors incubée 30 minutes à 37 degrés Celsius avec agitation, puis trois lavages successifs sont effectués pour chaque cupule.

Répartition du conjugué

On dispose 100 microlitres du conjugué dilué au 1/1000 dans chaque cupule, et l'on fait incuber la plaque 30 minutes à 37 degrés Celsius avec agitation.

Après cette incubation, le lavage doit être particulièrement soigné (au moins 6 lavages pour chaque cupule) afin d'éliminer toute trace d'antiglobuline fixée non spécifiquement.

Répartition du substrat

100 microlitres du substrat préparé extemporanément sont ajoutés dans chaque cupule. La plaque est mise à incuber 15 minutes à 37 degrés Celsius.

Lecture

Le lecteur automatique donne les résultats directement en densité optique par rapport à un témoin "blanc". Ce témoin est mesuré par le lecteur sur une colonne de cupules vierges lavées avec le liquide de lavage habituel et où sont déposés 100 microlitres de substrat.

Une expression plus fidèle des résultats (permettant d'éliminer les différences de plaque à plaque) est donnée en calculant le "R" du serum testé selon la formule:

$$R = \frac{\text{D.O. serum testé}}{\text{D.O. serum témoin négatif}}$$

B - ETUDE COMPARATIVE

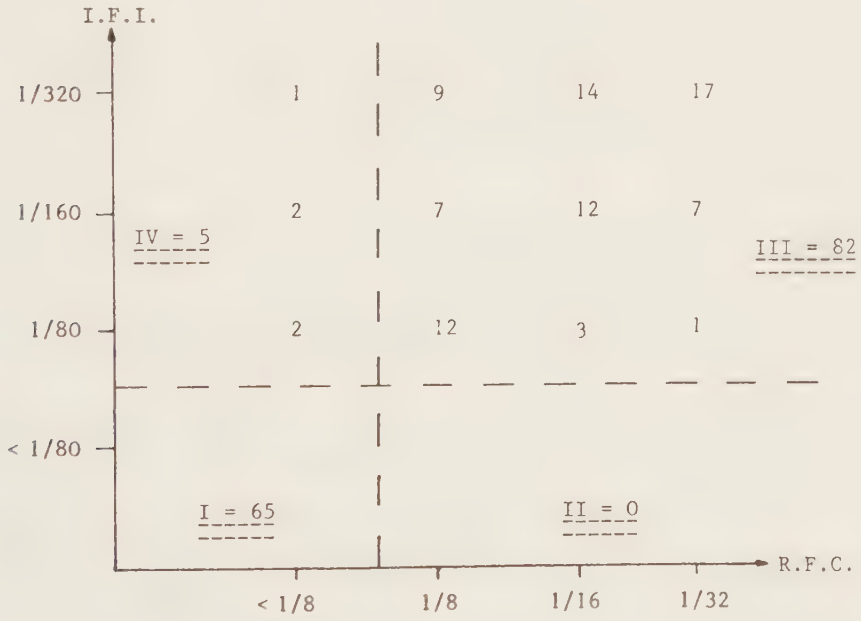
Nous avons testé 152 serums par les trois techniques (tous les serums positifs détectés par la R.F.C. plus un nombre à peu près équivalent de serums négatifs par cette même technique).

Avant d'envisager les différents profils sérologiques, concordants ou discordants, ainsi que les fréquences respectives de chacun d'entre eux, il convient de faire une étude comparative des tests deux à deux.

1 - R.F.C. et I.F.I.

La comparaison des résultats obtenus par ces deux techniques est représentée dans le tableau numéro 4. Pour chaque couple de valeurs correspondant aux coordonnées est indiqué le nombre de serums ainsi caractérisés.

Tableau n° 4. Comparaison R.F.C. - I.F.I.



On distingue 4 classes de valeurs pour l'I.F.I.: les serums négatifs (inférieurs au 1/80) et les serums positifs (1/80, 1/160 et 1/320). Il en va de même avec la R.F.C., mais pour des dilutions différentes (10 fois moindres)

Les seuils de positivité utilisés sont les seuils classiques pour ces deux techniques.

Les quadrants I et III correspondent aux serums concordants.

- I : 65 serums négatifs par les deux techniques soit 42,8 p.100.
- III : 82 positifs par les deux techniques soit 53,9 p.100.

Les quadrants II et IV correspondent aux serums discordants.

- II : aucun serum positif par la R.F.C. et négatif par l'I.F.I.
- IV : 5 serums positifs par l'I.F.I. et négatifs par la R.F.C. soit 3,3 p.100.

Globalement, nous pouvons dénombrer 147 serums concordants sur 152, soit 96,7 p.100, pour seulement 5 serums discordants, soit 3,3 p.100.

2 - R.F.C. et E.L.I.S.A.

Les résultats obtenus par ces deux techniques sont représentés dans le tableau numéro 5, avec le même système d'expression que précédemment.

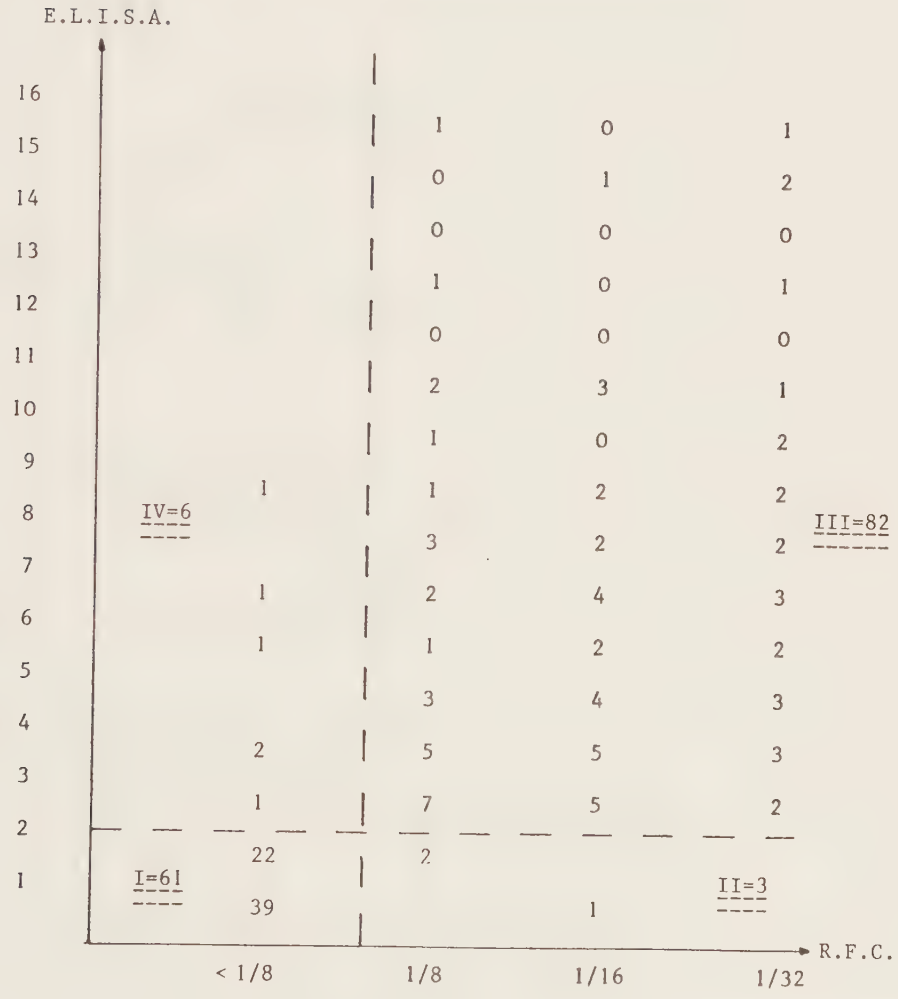
Les classes de valeurs pour la R.F.C. sont les mêmes que dans le tableau précédent, et celles retenues pour l'E.L.I.S.A. sont des intervalles de R = 1.

Le seuil de positivité de la R.F.C. est celui indiqué plus haut. Une étude précise amènerait à fixer le seuil de positivité pour le test E.L.I.S.A. à R = 1,75. Mais, par souci de simplification, le seuil de R = 2 a été retenu car il n'amène qu'un serum discordant supplémentaire.

Les quadrants I et III correspondent aux serums concordants.

- I : 61 serums négatifs par les deux techniques soit 40,1 p.100.

Tableau n° 5. Comparaison R.F.C. - E.L.I.S.A.



- III : serums positifs par les deux techniques: 82, soit 53,9 p.100.

Les quadrants II et IV correspondent aux serums discordants.

- II : serums négatifs par la technique E.L.I.S.A. et positifs par la R.F.C. : 3, soit 1,9 p.100.
- IV : serums négatifs par la R.F.C. et positifs par l'E.L.I.S.A. 6, soit 3,9 p.100.

Nous avons donc pour ces deux techniques:

- 143 serums dont les résultats concordent, soit 94,2 p.100.
- 9 serums dont les résultats discordent, soit 5,8 p.100.

3 - I.F.I. et E.L.I.S.A.

Les résultats obtenus par ces deux techniques sont rassemblés dans le tableau numéro 6. Le même système d'expression et les mêmes classes de valeurs que précédemment sont utilisés. Le seuil de positivité de l'E.L.I.S.A. est fixé à R = 2.

Quadrants I et III: serums dont les résultats concordent par les deux techniques.

- I : 66 serums négatifs par les deux techniques soit 43,4 p.100.
- III : 80 positifs par les deux techniques soit 52,6 p.100.

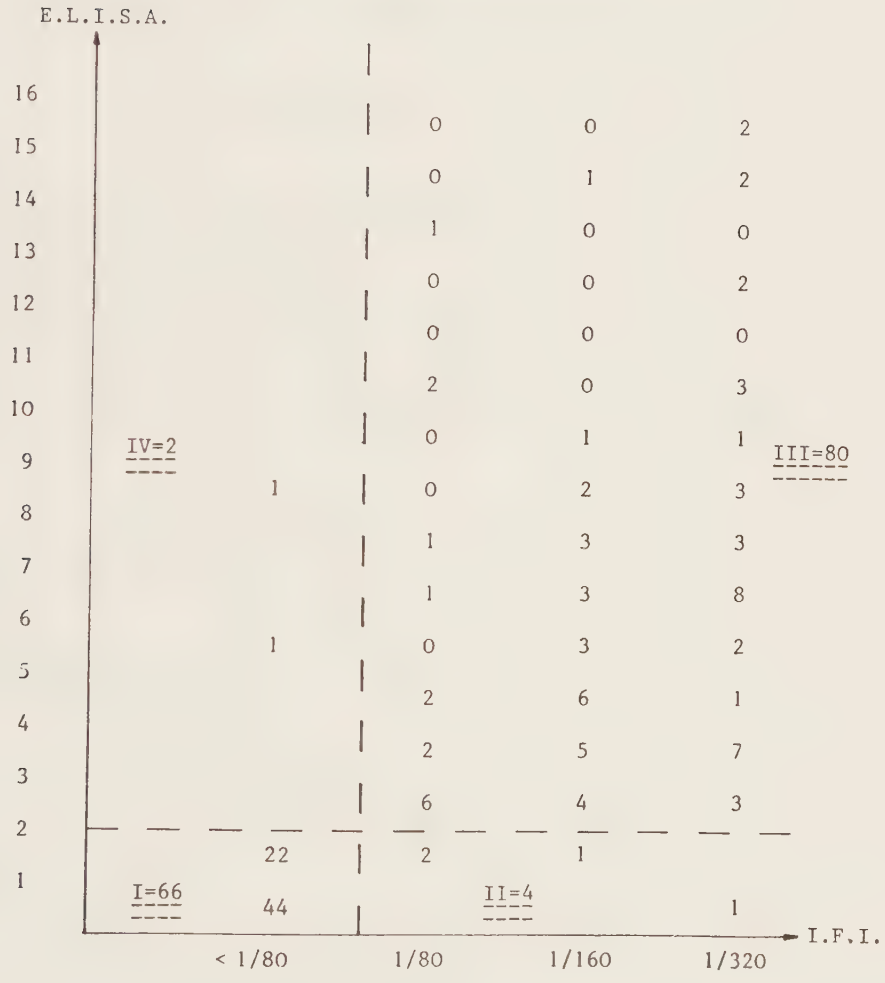
Quadrants II et IV: serums dont les résultats sont discordants par les deux techniques.

- II : serums positifs par l'I.F.I. et négatifs par l'E.L.I.S.A. 4, soit 2,6 p.100.
- IV : serums positifs par l'E.L.I.S.A. et négatifs par l'I.F.I. 2, soit 1,3 p.100.

Nous avons donc pour ces deux techniques:

- 146 serums dont les résultats concordent, soit 96,1 p.100.
- 6 serums dont les résultats discordent, soit 3,9 p.100.

Tableau n° 6. Comparaison I.F.I. - E.L.I.S.A.



4 - Profils sérologiques

Ces profils sérologiques permettent d'effectuer une étude comparative globale. Les résultats sont regroupés dans le tableau n°7.

Tableau n° 7. Profils sérologiques

PROFILS	CONCORDANTS		DISCORDANTS					
			EXCES			DEFAUTS		
	+	-	RFC	IFI	ELISA	RFC	IFI	ELISA
Nombre	78	64	0	2	2	3	0	3
TOTAL	142		10					
Pourcentage	93,4		6,6					

a - Profils entièrement concordants

Ce sont les profils pour lesquels les trois techniques donnent le même résultat pour un même serum.

On dénombre 78 serums pour lesquels les trois techniques donnent un résultat positif et 64 serums pour lesquels elles donnent un résultat négatif.

Nous avons donc 142 profils sérologiques concordants, soit 93,4 p.100 du nombre total.

b - Profils discordants

+ Deux techniques positives

On met vraissemblablement en évidence dans ce cas les défaillances de la troisième technique. Celà se produit:

- 3 fois pour la R.F.C.
- 3 fois pour l'E.L.I.S.A.

L'I.F.I. n'a jamais été la seule technique négative.

+ Deux techniques négatives

Dans ce cas, on met probablement en évidence les excès de la troisième technique. On a observé cela:

- 2 fois pour l'I.F.I.
- 2 fois pour l'E.L.I.S.A.

La R.F.C. n'a jamais été la seule technique positive.

On observe donc 10 profils discordants sur 152 serums testés, soit 6,6 p.100 de dissociations.

Tous ces résultats bruts méritent d'être discutés, pour essayer de cerner les valeurs biologiques et techniques des trois tests sérologiques.

C - DISCUSSION

1 - Valeur biologique des trois techniques

Au vu des résultats actuels, nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

- La R.F.C. semble très spécifique (aucun excès), mais moins sensible (trois défaillances).
- L'I.F.I. semble très sensible (aucune défaillance), mais pas toujours spécifique (deux excès).
- L'E.L.I.S.A. semble être de qualité intermédiaire (deux excès, trois défaillances).

Celà mériterait bien sûr confirmation sur un plus grand nombre de serums. (nous étions limité en effet par le faible nombre de serums positifs reçus au laboratoire).

Certaines dissociations peuvent toutefois faire l'objet d'une tentative d'explication. En effet, la cinétique des anticorps fait classiquement admettre que la R.F.C. est assez lente à se positiver. Celà expliquerait donc les trois défaillances de cette réaction, alors que l'I.F.I. et l'E.L.I.S.A. sont toutes deux positives. De la même manière, on peut expliquer les excès de l'I.F.I. ou de l'E.L.I.S.A. en invoquant des serums précoces ou tardifs, où le taux d'anticorps est faible, mais encore détectable par l'une ou l'autre de ces techniques très sensibles.

Mais, d'un point de vue général, on peut conclure au vu du fort taux de concordance (93,4 p.100) que ces trois techniques ont une valeur biologique sensiblement égale. Rappellons que pour assurer une bonne sensibilité, la réaction de fixation du complément utilise deux fois moins de complément (3 UH50) que les réactions classiquement décrites.

Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques devrait donc se fonder sur des critères plus techniques que biologiques, bien qu'il soit toujours préférable de ne pas se limiter à une réaction sérologique isolée, mais à plusieurs qui peuvent se compléter.

2 - Valeur technique des trois réactions

La valeur technique d'une réaction sérologique a trois composantes: la rapidité et la facilité de mise en oeuvre, la facilité de lecture et le prix de revient.

+ Rapidité et facilité de mise en oeuvre

Incontestablement, la R.F.C. est la réaction la plus

lourde à mettre en oeuvre, par le grand nombre de dilutions et de manipulations des serums qu'elle nécessite.

L'I.F.I. est facile à réaliser. Elle impose toutefois plusieurs dilutions de serum, ainsi que des temps de lavage assez longs. Cette réaction, comme la R.F.C., demande environ deux fois plus de temps que l'E.L.I.S.A. pour un même nombre de serums.

+ Facilité de lecture

La R.F.C. et l'E.L.I.S.A. ne posent aucun problème de lecture, que ce soit à l'oeil nu ou avec un appareil spécialisé.

Par contre, l'I.F.I. pose plusieurs problèmes de lecture, qui peut varier du fait de l'observateur et du microscope:

- En premier lieu celui de la subjectivité de la lecture: deux observateurs n'auront pas la même quantification de la fluorescence (expression en croix) pour un même serum.
- L'acuité visuelle pendant la lecture d'une I.F.I. est très variable, du fait de la fatigue de l'oeil engendrée par une observation microscopique prolongée.
- Enfin, des variations apparaissent avec le vieillissement de la lampe d'excitation.

Du point de vue de la lecture, le meilleur test est sans conteste l'E.L.I.S.A., si l'on dispose d'un lecteur automatique. Les résultats sont alors tout à fait reproductibles d'un laboratoire à l'autre.

+ Aspect économique

C'est assurément la R.F.C. qui impose le moindre coût, tant au niveau des réactifs que de l'appareillage.

Mais le coût relativement élevé des réactifs (princi-

palement des conjugués) est tempéré, notamment pour l'E.L.I.S.A., par le fait qu'ils sont utilisés très dilués (1/1000 pour l'E.L.I.S.A., 1/30 pour l'I.F.I.).

Le seul problème est posé par le prix de l'appareillage de lecture. Un lecteur automatique de D.O., comme un microscope à fluorescence coûtent assez cher. Le problème peut toutefois être détourné dans le cas de l'E.L.I.S.A. en effectuant une lecture à l'oeil nu, ou avec un spectrophotomètre non automatisé.

D'un point de vue technique, on peut donc dire que l'E.L.I.S.A. est une méthode beaucoup plus pratique, rapide et fiable que la R.F.C. ou l'I.F.I., son seul inconvénient étant le coût relativement élevé des réactifs et l'investissement de base assez important si l'on veut disposer d'une lecture totalement automatisée.

L'excellente valeur technique et biologique des tests immunoenzymatiques, démontrée pour le diagnostic de nombreuses maladies, semble donc se retrouver dans le cas de l'épididymite contagieuse du bélier.

II . ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE DANS LES HAUTES PYRENEES.

Le but initial de ce travail était de faire le point sur l'épididymite contagieuse du bélier dans le Sud-Ouest de la France. Mais la difficulté pour récolter des serums a fait que ce bilan ne porte que sur le département des Hautes Pyrénées, en sachant toutefois que ce département représente une composante très importante de l'élevage ovin du Sud-Ouest.

A - BASES DE L'ENQUETE

1 - Organisation de l'élevage ovin dans le département

On peut distinguer deux types de cheptels dans le département:

- D'une part un élevage sédentaire, localisé au Nord de Tarbes, représentant 10 p.100 du cheptel total. Les animaux de ce type d'élevage n'ont que peu de contacts avec ceux du deuxième type, ne pratiquant ni la transhumance, ni la présentation aux concours.
- D'autre part, un élevage traditionnel, destiné à l'embouche, situé au Sud de Tarbes. C'est le plus important (90 p.100 du cheptel total). Les troupeaux passent l'hiver dans les vallées, et pratiquent la transhumance l'été. Chaque vallée est séparée des autres, ce qui explique certaines différences dans la salubrité générale des cheptels. Par exemple, alors que tout le troupeau au Sud de Tarbes est très infecté de brucellose abortive ovine, une vallée se distingue (celle de Lourdes) avec seulement 0,2 p.100 d'infection détectée par l'E.A.T. Par contre, au sein d'une même vallée, les brassages d'animaux

sont très importants (transhumance collective). Celà a donc une grande répercussion sur la transmission des maladies infectieuses.

2 - Résultats antérieurs

C'est en 1976 que les Services Vétérinaires du département ont pris conscience de la maladie. C'est en effet à cette époque qu'un centre de testage de béliers destiné au prêt a été constitué dans le département, composé par moitié de béliers venus du Cher, l'autre moitié étant fournie par les races locales.

Au début de la saison de lutte, un dépistage sérologique a été demandé au Laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs de Maisons-Alfort afin de rechercher l'infection par Brucella ovis. La sérologie (R.F.C.) détecta alors 50 p.100 d'infectés (13 sur 25), aussi bien parmi les béliers du Cher que parmi ceux du département.

Alarmés, les Services Vétérinaires se sont alors livrés à une enquête en amont et en aval pour rechercher l'origine de l'infection. Ils ont rapidement pu mettre hors de cause les béliers du Cher, et se sont alors aperçus avec surprise que c'était les béliers locaux qui avaient contaminé leurs congénères.

Une brève enquête dans le département a alors fait ressortir que les éleveurs, aussi bien que les praticiens vétérinaires, savent que des problèmes de fertilité existent chez leurs béliers depuis longtemps Ils doivent en effet utiliser un bélier pour 40 à 45 brebis, alors que la moyenne théorique, respectée par exemple dans le bassin de Roquefort, est de un bélier pour 50 à 55 brebis. Mais, étant donnée la structure pastorale de l'élevage local, cet état de fait les a assez peu gêné, et ils n'ont jamais éprouvé le besoin d'aller plus avant dans la connaissance de cette maladie.

Depuis ce jour, quelques sondages restreints ont été

réalisés:

- En 1976, chez les éleveurs où les béliers du centre de prêt avaient été introduits: 13 positifs sur 71 soit 18,3 p.100.
- En 1979, sondage sur quelques béliers présentés à des concours: 11 positifs sur 60 soit 18,3 p.100.
- En 1980, quelques éleveurs font une demande d'examen: 3 positifs sur 29 soit 10,4 p.100.

Ces quelques chiffres, s'ils indiquent que la maladie existe bien dans le département, n'ont qu'une valeur approximative. En effet, le choix des échantillons ainsi que le nombre d'animaux testés rendent ces résultats statistiquement peu fiables. Il semble toutefois établi que la maladie ait une répercussion extrêmement faible (voisine de 0 p.100) dans la zone d'élevage sédentaire.

B - METHODOLOGIE

1 - Collecte des échantillons

Deux enquêtes séparées dans le temps ont été effectuées, portant chacune sur un sexe différent.

Durant l'année scolaire 1979-1980, Mlle ECHE, stagiaire au Laboratoire d'Immunologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, a analysé par R.F.C. 856 serums de brebis. Ces serums ont été envoyés par le laboratoire de la Direction des Services Vétérinaires de Tarbes, au cours de la prophylaxie de la brucellose abortive.

Pour notre part, nous avons choisi en 1981 de collecter des serums de béliers dans ce même département. Ces serums ont été prélevés sur les béliers se présentant aux concours régionaux. En effet, chaque vallée organise tous les ans un concours pour sélectionner les plus beaux reproducteurs, principalement en vue de la conservation des

races locales. Les béliers présentés à ces concours, choisis uniquement sur des critères ethnologiques et zootechniques, proviennent de la seule vallée concernée et sont représentatifs de la totalité du cheptel de cette vallée.

Nous avons ainsi pu prélever des serums à tous les concours, correspondant à 556 échantillons. Ces 556 béliers représentent environ 15 p.100 du nombre total de béliers dans le département.

2 - Analyse des serums

Dès leur arrivée au laboratoire, les serums sont décomplémentés, et testés par la R.F.C. Ils sont ensuite congelés pour leur conservation, faisant par la suite l'objet d'analyses en I.F.I. et en E.L.I.S.A.

La R.F.C. a été choisie pour tester les serums pour plusieurs raisons:

- Durant l'année scolaire 1979-1980, les serums ont été analysés uniquement par cette méthode, l'I.F.I. et l'E.L.I.S.A. n'étant pas encore mises au point.

- Tous les résultats antérieurs, en France et dans le Monde, ont été obtenus par cette méthode. Une comparaison valable des taux d'infection ne peut donc être effectuée que si l'on utilise la R.F.C.

- Enfin, une confirmation a posteriori est donnée par les résultats de la partie précédente, qui montrent que les trois techniques sont de qualité sensiblement équivalente.

C - RESULTATS

1 - Taux d'infection global

Lors de la première enquête sur les brebis, 23 brebis ont

été reconnues positives sur 856 testées, soit un taux de 2,7 p.100.

L'enquête portant sur les béliers a décelé 79 béliers positifs sur 556, soit 14,2 p.100.

2 - Taux d'infection local

Nous ne disposons pas de renseignements très précis sur la provenance des brebis détectées. Les béliers positifs proviennent tous de la zone d'élevage transhumant, où 6 concours ont lieu chaque année. Les résultats par concours (donc par vallée) sont répertoriés dans le tableau numéro 8.

Tableau n° 8. Résultats obtenus dans chaque concours.

CONCOURS	CAMPAN	ESPARROS	LOURDES	MAULEON	NISTOS	SARRANCOLIN
Nombre de béliers présentés	59	40	117	64	36	195
Nombre de béliers positifs	12	2	22	14	6	18
Pourcentage de positivité	20,3	5	18,8	21,9	16,7	9,2

D - DISCUSSION

1 - Renseignements épidémiologiques

Nous ne pouvons tirer de conclusion que pour la zone d'élevage transhumant. Le chiffre de 14,2 p.100 se situe dans la moyenne des chiffres observés les années précédentes. Toutefois, il parait clair

que l'on peut accorder plus de crédit à ce dernier pourcentage, étant données la quantité et la nature des divers échantillons en présence. Ce chiffre parait en effet significatif, les analyses ayant été faites sur 556 béliers soit 15 p.100 du cheptel, alors que les échantillons des années précédentes étaient dix fois plus restreints. D'autre part, le critère de choix zootechnique de l'échantillon est aléatoire, car il ne tient pas compte du taux de fertilité ni du niveau sanitaire général des élevages.

Ce pourcentage parait correspondre au taux d'infection naturelle, puisqu'aucune prophylaxie de cette maladie n'existe dans le département. La prophylaxie de la brucellose abortive ne peut influer sur ce taux, puisque la vaccination des béliers à l'aide du vaccin Rev1 (seul vaccin hétérologue pouvant être employé sans risque contre l'épididymite contagieuse) est interdite en France (sauf rares dérogations).

D'autre part, on peut remarquer une différence importante entre le taux d'infection des brebis et celui des béliers. Cette différence, chiffrée pour la première fois dans la région, peut s'expliquer par le fait que les brebis présentent une réponse sérologique modérée et fugace à l'infection par Brucella ovis. La cinétique des anticorps n'excède en effet jamais une saison de lutte, et n'est pas présente chez toutes les brebis infectées. (cf. étude bibliographique).

Enfin, on peut noter des différences entre les vallées. Mais il faut tenir compte de la faiblesse de certains échantillons et se garder d'en tirer des conclusions trop hâtives, et difficilement justifiables sur un plan statistique.

Par contre, il est facile de constater que la prophylaxie sanitaire de la brucellose abortive n'influe pas sur le taux d'infection par Brucella ovis. Des vallées indemnes comme celle de Lourdes présentent de forts taux d'infection par Brucella ovis (18,8 p.100), alors que des vallées très touchées par la brucellose abortive comme celle de Sarrancolin (6 à 8 p.100 d'infectés) ont un taux d'épididymite relati-

vement bas. (9,2 p.100).

Ces deux maladies, bien que dûes à des germes assez voisins, sont donc indépendantes à l'échelon collectif. Elles peuvent coexister dans un cheptel, mais aucun des animaux que nous avons testé ne présentait d'infection double par Brucella ovis et par Brucella melitensis ou Brucella abortus. Ces deux infections s'excluraient donc à l'échelon individuel.

2 - Comparaison avec les résultats antérieurs

a - En France

Nous ne disposons actuellement en France que des résultats de GIAUFFRET et SANCHIS. Ils portent sur les béliers de Haute Provence et des Bouches du Rhône. Le taux d'infection que nous avons relevé dans les Pyrénées est tout à fait comparable à celui enregistré par ces auteurs.

Toutefois, le département de l'Aveyron a procédé à une enquête sur tous les béliers de son département (bassin de Roquefort) et n'a trouvé aucun animal infecté.

Pour notre part, su 161 serums reçus du département de la Haute Garonne, aucun n'était positif. L'échantillonnage étant criticable (il ne couvre qu'une faible partie du département), nous ne tirerons pas de conclusion à caractère définitif. Mais le taux de 0 p.100 reste tout de même le plus vraissemblable.

On peut donc dire, sachant que l'infection existe (à un taux d'environ 15 p.100) dans les zones d'élevage ovin pratiquant la migration d'estive, que la transhumance est un facteur fondamental dans la transmission de l'infection par Brucella ovis. En effet, dans les départements où l'élevage ovin est sédentaire (Aveyron, Haute Garonne où des résultats sont connus), la maladie parait avoir une incidence négligeable.

b - Autres pays

Le taux d'infection de 14,2 p.100 que nous avons relevé est tout à fait comparable à celui observé dans les pays atteints (Europe de l'Est, Australie, Nouvelle Zélande...). Il correspond au taux normal d'incidence de la maladie.

La seule différence enregistrée est la coexistence à l'échelon collectif de l'infection par Brucella ovis et de celle par Brucella melitensis et Brucella abortus, alors que la brucellose abortive n'existe pas ou très partiellement dans le Nouveau Londe. C'est la raison probable pour laquelle ces pays se sont préoccupés les premiers de cette maladie, alors que les pays d'Europe voyaient leur attention captée par la brucellose abortive.

CONCLUSION GENERALE

Il apparait donc que l'épididymite contagieuse du bélier sévit en France, caractérisée dans cette étude par un taux d'infection de 14,2 p.100. Compte tenu de la structure pastorale de l'élevage dans le Sud de notre pays, l'attention des éleveurs n'a pas encore vraiment été attirée vers ce problème.

Mais, dans le contexte actuel d'intensification progressive de l'élevage ovin, et compte tenu de la tension vive régnant sur le marché de la viande ovine au sein de la C.E.E., imposant une réduction importante des marges bénéficiaires, la maîtrise de tous les facteurs de productivité, au premier desquels on trouve la fertilité du troupeau, seront un atout majeur pour les éleveurs dans les années à venir.

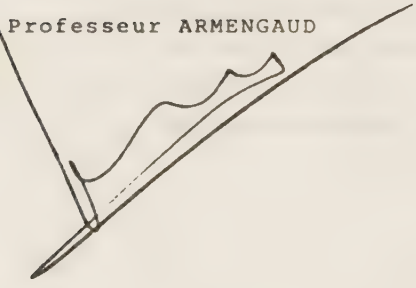
C'est pourquoi il parait indispensable de disposer de moyens fiables pour détecter l'infection à Brucella ovis, source d'infertilité chez les béliers. Les techniques sérologiques que nous avons adaptées au diagnostic de cette infection n'en sont qu'à leurs début mais, au vu des premiers résultats, présentent une très grande concordance. Ces méthodes de diagnostic doivent donc être développées pour prendre une place importante, voire même prépondérante, dans l'éventail des techniques diponibles pour le diagnostic sérologique de l'épididymite contagieuse des béliers.

Vu : Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

Professeur R. LAUTIE

Le Président de la Thèse

Professeur ARMENGAUD



Vu et permis d'imprimer
Toulouse, le 30.09.91
l'Administrateur provisoire de
l'Université Paul Sabatier

Professeur D. BANCEL

BIBLIOGRAPHIE

1 - AFANAS'EV (B,N), BSHKATOV (G,A) et TUKVATSHINA (A,S). Eradication of ovine infectious epididymitis. Veterinaryia, 1971,5,50-51.

2 - ALTON (C,G), JONES (L,M) et PIETZ (D,E). La brucellose. Techniques de laboratoire. Monographie O.M.S. n° 55, 2° édition, 1977.

3 - ANGHEL (C) et ANGHEL (S). Recherches épizootologiques et anatomo-cliniques sur l'épididymite infectieuse. Rec.Med.Vet.Ec.Alfort.1970,146, 15-24.

4 - BAKURDJIEV (K). Fertility of rams with infectious epididymitis. Veterinarnomeditsinski nauki,1972,9,8,53-57.

5 - BAKURDJIEV (K) et KOKOSHAROV (T). Comparative diagnostic studies on epididymitis in rams caused by Brucella ovis. Veterinariya,1976,13,2,82.

6 - BAKURDJIEV (K) et KRUSTEV (K,H). Autophagocytosis of spermatozoa in rams with a Brucella ovis infection. Veterinariya,1976,13,6,44-51.

7 - BAKURDJIEV (K) et KRUSTEV (K,H). Ultrastructural changes in testis and epididymis of rams with infectious epididymitis. Veterinariya, 1978, 15, 44-51.

8 - BSHKATOV (G,A) et ANAFAS'EV (B,N). La rentabilité de la prophylaxie pour éliminer l'épididymite infectieuse des béliers. Veterinariya, 1973, 10,52-53.

9 - BIBERSTEIN (E,L) et Mc GOWAN (B). Epididymitis in rams. Studies on laboratory diagnosis. Cornell Vet. 1958,48,1,31-44.

10 - BIBERSTEIN (E,L), Mc GOWAN (B), ROBINSON (E,A) et HARROLD (D,R). Epididymitis in rams. Studies on immunity. Cornell Vet.1962,52,214-227.

11 - BIBERSTEIN (E,L), Mc GOWAN (B), HARVEY-OLANDER et KENNEDY (P,C). Pathogenesis of epididymitis in rams. Cornell Vet.1964,54,1,27-41.

12 - BLOOD (D,C) et HENDERSON (J,A). In Medecine vétérinaire,1971, 1° édition Vigot Frères, Paris, p.412.

13 - BRINLEY-MORGAN (W,J) et Mc CULLOUGH (N,B). In Bergey's manual of determinative bacteriology,8° édition,Williams and Wilkins,N.Y,p.282.

14 - BROWN (G,M), PIETZ (D,E) et PRICE (D,A). Studies on the transmission of Brucella ovis infection in rams. Cornell Vet. 1973,63,1,29-40.

15 - BROWN (G,M), RANGER (C,R) et KELLEY (D,J). Selective media for the isolation of Brucella ovis. Cornell Vet. 1971,61,265-280.

16 - BRUERE (A,N) et WEST (D,M). CFT inaccurates for epididymitis. N.Z.Vet. J. 1978,26,115.

17 - BRUNNER et GILLEPSIE. In Hagan'sinfectious diseases of domestics animals, 5° édition, Tindall et Cassel éditeurs, Londres, 304-305.

18 - BUDDLE (M,B). Vaccination in the bontrol of Brucella ovis infection in sheep. N.Z.Vet.J. 1958,6,41-46.

19 - BUDDLE (M,B). Infection à "Brucella ovis" chez le mouton en Nouvelle Zélande. Bull.Off.Int.Epizoot. Rapport à la 27°session,1959,R.N.509.

20 - BUDDLE (M,B) et BOYES (B,W). Epididymitis of rams. Aust.Vet.J. 1953, 29,145.

21 - BUDDLE (M,B), CAVERLEY (F,K) et BOYES (B,W). Brucella ovis vaccination in rams. N.Z.Vet.J. 1963,11,90-93.

22 - CAMERON (R,D,A), CARLES (A,B) et LAUERMANN (L,H). The incidence of Brucella ovis in some Kenya flocks and its relationship to clinical lesions and semen quality. Vet.Rec.1971,89,21,552-557.

23 - CARLIER (Y), BOUT (D) et CAPRON (A). Automation of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). J.Immunol.Methods.1979,31,237-246.

24 - CLAPP (K,H). A complement fixation test for the diagnosis of ovine brucellosis with special reference to epididymitis. Aust.Vet.J.1955,31, 27-28.

25 - CLAPP (K,H), KEOGH (J) et RICHARDS (M,H). Epidemiology of ovine brucellosis in South Australia. Further observations. Aust.Vet.J. 1962, 38,482-486.

26 - CLAPP (K,H), SYMONS (L,E,A) et DOOLETTE (J,B). The application of a CFT to yhe diagnosis of ovine brucellosis. Aust.Vet.J.1955,31,29-30.

27 - CLAXTON (P,D). Brucella ovis vaccination of ram.A comparison of two commercials vaccines and two methods of vaccination.Aust.Vet.J.1968,44,

2, 48-54.

28 - COX (J,C), GORRIE (C,J,R) et WARD (H,A). A comparison of methods for the serological diagnosis of Brucella ovis infection. Br.Vet.J. 1977,133, 442-445.

29 - CUBA -CAPARO (A) et MYERS (D,M). Pathogenesis of epididymitis caused by Brucella ovis in laboratory animals. Am.J.Vet.Res.1973,34,1077-1085.

30 - DIAZ (R), JONES (L,M) et WILSON (J,B). Antigenic relationship between Brucella ovis and Brucella melitensis.J.Bact.1967,93,4,1262 -1268.

31 - DIAZ (R) et BOSSERAY (N). Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des Brucella. Ann.Rech.Vétér.1973,4, 2,283-292.

32 - EDGAR (D,G). The detection of Brucella ovis infection in rams. N.Z.Vet.J.1959,7,64-66.

33 - ENGVALL (E).Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology. Med.Biol.1977,55,193-200.

34 - EKDAHL (M,O), MONEY (D,F,L) et MARTIN (C,A). Some aspects of epididymitis of rams in New Zealand. N.Z.Vet.J.1968,16,81-82.

35 - Mc FARLANE (D), JEBSON (W,L), HARTLEY (W,J), SALISBURY (R,M), Mc CLURE (T,J) et OSBORN (H). Ram epididymitis, ewe abortion and lamb neonatal mortality.Aust.Vet.J.1952,28,226.

36 - GANIERE (J,P). Notions générales sur la recherche épidémiologique. Rev.Med.Vet.1978,129,4,545-564.

37 - GARCIA-CARILLO (C), CUBA-CAPARO (A) et MYERS (D,M). Suceptibilidad comparada de cabritos y carneros a la infeccion causada por Brucella ovis. Estudios serologicos y pathologicos. Gac.Vet.1974,36,355-374.

38 - GELEV (I). On the specificity of the CFT in ovine brucellosis with a view to the antigenic similarity between Brucella melitensis and Brucella ovis. Veterinariya,1971,8,5,42.

39 - GELEV (I). A method for obtaining a lipopolysaccharide from Brucella. Veterinariya,1973,10,37.

40 - GELEV (I). Differential diagnosis of Brucella infection in sheep

with a positive reaction for brucellosis after complement fixation test. Veterinariya,1974,11,1,29.

41 - GELEV (I) et DOUMANOV (J). Serological diagnosis of sheep infected with Brucella ovis. Veterinariya,1971,8,2,54.

42 - GIAUFFRET (A) et SANCHIS (R). Rapport sur les travaux concernant l'épididymite contagieuse des béliers.1973. Laboratoire régional de recherches vétérinaires de Nice.

43 - CIAUFFRET (A) et SANCHIS (R). Etude d'un foyer d'épididymite contagieuse du bélier. Eradication de la maladie. Bull.Off.Int.Epizoot. 1974, 82,581-586.

44 - GIAUFFRET (A), SANCHIS (R) et GAUMONT (R). Epididymite contagieuse du bélier à Brucella ovis dans le Sud-Est de la France. Bull.Acad.Vet.Fr. 1972,9,469-473.

45 - GLOTOV (G,N), STEPANOVA (K,E), VOLCHENKO (A), PAUTOV (V) et TUROVA (R,I). Epidemoilogy of disease produced by Brucella ovis in sheep. Veterinariya,1975,12,50-52.

46 - GORRIE (C,J,R). Diagnosis of ovine brucellosis. Aust.Vet.J.1959,35, 500-501.

47 - Mc GOWAN (B). Epididymitis in rams. Effects of vaccination and culling on the clinical incidence of the disease.Cornell.Vet.1979,69,1, 67-72.

48 - Mc GOWAN (B). Epididymitis in rams. Studies on vaccine efficacity. Cornell.Vet.1979,69,1,73 - 76.

49 - Mc GOWAN (B) et DEVINE (D,R). Epididymitis of rams. The effects of the naturally occuring disease upon fertility. Cornell Vet.1960,50,102-106.

50 - Mc GOWAN (B) et SHULTZ (G). Epididymitis of rams. Clinical description and field aspects.Cornell Vet.1956,46,277-281.

51 - GRADWELL (D,V) et Van ZYL (F,E). Effectivity of Revl vaccine in rams against Brucella ovis infection. Jl.S.Afr.Vet.Med.Ass.1975,46,4,349-351.

52 - GUNN (R,M,C) et SANDERS (R,M). Conf.Rep.In Bull.Coun.Scient.Ind.Aust. n° 148,1942.

53 - HALL (W,T,K). Epididymitis in rams. Studies on the skin sensitivity and pathology. Aust.Vet.J.1955,31,7-9.

54 - O'HARRA, ANDERSON et WEDDLE. CFT inaccurates for epididymitis. N.Z.Vet.J. 1978,26,115-116.

55 - HAUGHEY (K,G). The apparent failure of a vaccine to protect rams against naturally occuring Brucella ovis infection.Aust.Vet.J.1969,45, 1,10-12.

56 - HECK (F,C), WILLIAMS (J,D) et PRUETT (J). Interpretation of spectrophotometric absorbance value to define results of Enzyme Linked Immunosorbent Assay. J.Clin.Microbiol. 1980,11,4,398-401.

57 - Van HEERDEN (K,M) et Van RENSBURG (S,W). Results obtained by the use of Revl vaccine in sheep against infectious infertility suspected to be caused by ovine brucellosis. Bull.Off.Int.Epizoot.1964,62,997-1002.

58 - HICKS (J,D), BURR (G,R), MARSHALL (D,R) et WIDDLER (B,M). CFT inaccurates for epididymitis. N.Z.Vet.J.1978,26,5,135.

59 - HOERLEIN (A,B). Bacterial infertility in domestics animals. In Comparative aspects of Reproductive Failures.Ed. Kurt Benirschke,1966,271-273.

60 - HOPKINSON (W,I) et LLOYD (J). Brucella ovis in merino rams in Western Australia. Aust.Vet.J.1979,55,4,200-201.

61 - HUGES (K,L). Experimental Brucella ovis infection in ewes. 1-Breeding performances of infected ewes. 2- Correlation of infection and complement fixation titres. Aust.Vet.J.1972,48,12-22.

62 - HUGES (K,L) and CLAXTON (P,D). Brucella ovis infection. An evaluation of serological, microbiological and clinical methods of diagnosis in the ram. Aust.Vet.J.1968,44,2,41-47.

63 - IONESCU (I). Preparation of purified antigen for the diagnosis of infectious epididymitis in rams. Lucarile Inst.de Cercetari Vet.Sci Biopreparate Pasteur,1973,10,29-46.

64 - JONES (L,M), DUBRAY (G) et MARLY (J). Comparison of methods of diagnosis of Brucella ovis infection in rams.Ann.Rech.Vétér.1975,6,1,11-12.

65 - KADAR (I) et BANFALVI (E). Isolation of Brucella ovis from aborted

sheep fetuses and serological methods to detect infection in ewes and rams. Magy.Allatorv.Lap.1979,34,8,542-544.

66 - KATER (J,C) et HARTLEY (W,J). Lameness in rams following vaccination against Brucella ovis infection. N.Z.Vet.J.1963,11,65-67.

67 - KATMAZOVA (E,I), KURDINA (D,S) et DRANOVSKAYA (E,A). Characteristics of Brucella ovis cultures. Veterinariya,1971,10,44-46.

68 - KENNEDY (P,C), FRAZIER (L,M) et Mc GOWAN (B). Epididymitis in rams. Pathology and bacteriology. Cornell Vet.1956,46,303-319.

69 - KEOGH (J) et DOOLETTE (J,B). The epidemiology of ovine brucellosis in South Australia. Aust.Vet.J. 1959,34,412-417.

70 - KOMISSAROVA (L,I). Pathological and histological changes in rams and ewes infected with Brucella ovis. Sb.Rab.Leningr.Vet.Inst.1975,40,240-245.

71 - KOVACS (L). Expérience de lutte contre Brucella ovis dans les grandes bergeries. In Symposium méditerranéen sur les maladies du mouton, Ile de Rhodes, 1970.

72 - KUPPUSWAMY (P,B). Chimiothérapie des brucelloses chez le bélier. N.Z.Vet.J.1954,2,4,110.

73 - LAMB (V,L), JONES (L,M), SHURIG (G,G) et BERMAN (D,T). ELISA for bovine immunoglobulin subclass. Specific response to Brucella abortus lipopolysaccharides. Inf.Immunity, 1979,26,1,240-247.

74 - LAUERMANN (L,H), MESFIN (G,M), OTIM (C,P) et MUHAMMAD (S,I). Duration of Brucella ovis infection in ewes. Cornell Vet.1975,65,2,221-227.

75 - LAWRENCE (W,E). Ovine brucellosis. A review of the diseases in sheep manifested by epididymitis and abortion. Br.Vet.J.1961,117,435.

76 - De LONG (W,J), WALDAHM (D,G) et HALL (R,F). Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and Eastern Oregon flocks. Am.J.Vet.Res.1979,40,1,101-102.

77 - LUDFOR (C,G). Experimental Brucella ovis infection in rams. Aust.Vet. J.1972,48,6,313-317.

78 - MARMONIER (A) et BERTHET (B). Application de la technique immuno-enzymatique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) au diagnostic

sérologique des brucelloses humaines. 1 - Evaluation de quelques paramètres de la réaction et réalisation pratique. Path.Biol.1981,29,2,77-81.

79 - MASALSKI (N). Dynamics of IgM and IgG in rams experimentally infected with Brucella ovis. Veterinariya, 1973,10,10,29-34.

80 - MATTHEWS (T,R) et TRUEBLOOD (M,S). Duration of precipitins against Brucella ovis. Cornell Vet. 1967,57,3,410-417.

81 - MEINERSHAGEN (W,A), FRANK (F,W) et WALDAHM (D,G). Brucella ovis as a cause of abortion in ewes. Am.J.Vet.Res. 1974,35,5,723-724.

82 - MEYER (M,E) et CAMERON (H,S). Recherches sur l'agent étiologique de l'épididymite des béliers. Am.J.Vet.Res.1956,17,495-497.

83 - MEYER (M,E). Evolution and taxonomy in the genus Brucella.Progesterone induction of filtrable forms of Brucella abortus type 2 with revertant characteristics essentially indistinguishable in vitro from those of Brucella ovis. Am.J.Vet.Res.1976,37,2,211-214.

84 - MILLER (S,J) et MOULE (G,R). Clinical observations on the reproductive organs of merino rams in pastoral Queensland.Aust.Vet.J.1954,30, 353-363.

85 - MONGET (D). L'orthotolidine: un révélateur plus sensible de la péroxydase dans la méthode immunoenzymatique ELISA. Ann.Biol.Clin. 1978,36, 527-528.

86 - MORELLO (J,A), JENSEN (R), FLINT (J,C) et COLLIER (J,R). Placental lesions of sheep experimentally infected with Brucella ovis. Am.J.Vet.Res. 1963,24,9,897-904.

87 - MORRIS (J,A). The use of the polyacrylamide gel electrophoresis in taxonomy of Brucella. J.Gen.Microbiol.1973,76,231-237.

88 - MUNCZ (F), KORMENDY (B) et STIRLIGNE (M,M). Value of the gel diffusion test for detecting Brucella ovis infection. Magy.Allatovv.Lap. 1978,33, 11,751-772.

89 - MURRAY (R,M). Scrotal abnormalities in rams in tropical Queensland with particular reference to ovine brucellosis and its control. Aust.Vet.J. 1969,45,63-67.

90 - MYERS (D,M). Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by Brucella ovis. Appl.Microbiol. 1973,26,6,855-857.

91 - MYERS (D,M) et VARELA-DIAZ (V,M). Serodiagnosis of ram epididymitis by counterimmunoelectrophoresis (C.I.E.) using Brucella ovis surface R antigen. J.Clin.Microbiol. 1979,10,4,451-453.

92 - N... Epididymitis of rams (Brucella ovis infection). In Merck Veterinary Manual, 3° édition (1967), Merck & Co edit. Rahway, N.J.,855-863.

93 - NIEBERLE et COHRS. In textbook of special pathological anatomy of domestics animals. Pergamon Press,1967,807.

94 - OSBORNE (H,G). Epididymitis of rams. Aust.Vet.J. 1955,31,11-16.

95 - OSBURN (B,I) et HOSKINS (R,K). Antibody responses to Brucella ovis in maternal and fetal sheep. J.Infect.Dis. 1969,119,3,267-271.

96 - OSBURN (B,I) et KENNEDY (P,C). Pathologic and immunologic responses of the fetal lamb to Brucella ovis. Path.Vet.1966,3,110-136.

97 - PELLERIN (J,L), GERAL (M,F) et LAUTIE (R). Le test immunoenzymatique E.L.I.S.A. dans le diagnostic sérologique de la brucellose humaine. Rev.Med.Vet.1980,131,11,741-766.

98 - PIROIRD (R) et LOMBARD (M). Les méthodes immunoenzymatiques et leurs applications sérologiques. Rev.Med.Vet. 1980,131,1,25-42.

99 - QUINLIVAN (T,D) et WALLACE (G,V). Brucella ovis vaccination of rams. N.Z.Vet.J. 1975,23,183.

100 - RAHALEY (R,S). Serological comparison between Histophilus ovis, Actinobacillus seminis and Brucella ovis. Aust.Vet.J. 1978,54,423.

101 - RENOUX (G). Adv.Vet.Sci. 1957,3,251-273.

102 - RENOUX (G) et MAHAFFEY (L,W). Sur l'existence probable de nouveaux antigènes des Brucella avec nouveau schéma proposé pour représenter la répartition des antigènes.Annls.Inst.Pasteur,Paris,1955,88,528-532.

103 - RIS (D,R). The persistance of antibodies against Brucella ovis and Brucella abortus in rams following vaccination. A field study. N.Z.Vet.J. 15,94-99.

104 - RIS (D,R). The complement fixation test for the diagnosis of Brucella ovis infection in sheep. N.Z.Vet.J. 1974,22,143-146.
105 - RIS (D,R). Intraperitoneal administration of Brucella ovis saline-in-oil vaccines. N.Z.Vet.J. 1979,27,8,165.
106 - RIS (D,R) et TE PUNGA (W,A). An indirect haemagglutination test for the detection of Brucella ovis antibodies. N.Z.Vet.J. 1963,11,94-97.
107 - ROMAKHOV (V,A). Indirect haemagglutination and antibody neutralisation tests for infectious epididymitis of rams. Trudy Gos.Inst.Eksp.Vet. 1978,47,76-83.
108 - RUITENBERG (E,J), SEKHUIS (V,M) et BROSI (B,J,M). Some characteristics of a new multiple-channel photometer for through-the-plate reading of microplates to be used in Enzyme Linked Immunosorbent Assay. J.Clin. Microbiol. 1980,11,2,132-134.
109 - RYAN (F,B). Eradication of ovine brucellosis.Aust.Vet.J.1964,40 162-165.
110 - SANCHIS (R) et GIAUFFRET (A). L'épididymite contagieuse du bélier (Infection à Brucella ovis). Rec.Med.Vet.1975,151,12,791-798.
111 - SANCHIS (R) et GIAUFFRET (A). Mise au point d'une microtechnique de fixation du complément appliquée au sérodiagnostic de l'épididymite contagieuse du bélier. Rec.Med.Vet. 1976,152,5,305-310.
112 - SAUNDERS (G,C), CLINARD (E,H), BARLETT (M,L) et SANDERS (W,L). Application of the indirect enzyme-labelled antibody microtest to the detection and surveillance of animal diseases. J.Infect.Dis.1977,136, S258-S266 (Supplement).
113 - SAURAT (P) et GANIERE (J,P). L'immunofluorescence dans le diagnostic sérologique de la brucellose bovine. Cah.Med.Vet.1976,45,18-30.
114 - SHERGIN (Y,K), VOZDAEV (N,S) et KIM (V,I). Infectious epididymitis of rams. Veterinariya,1974,11,58-59.
115 - SIMMONS (G,C) et HALL (W,T,K). Epididymitis of rams. Preliminary studies on the occurence and pathogenicity of a Brucella-like organism. Aust.Vet.J. 1953,29,2,33.

116 - SIMMONS (R,E), BROWN (G,M), RANGER (C,R) et PIETZ (D,E). A survey of the incidence of ram epididymitis in Idaho caused by Brucella ovis. Proceeding 74° annual meeting of the U.S. animal health association, 1971,175 - 180.

117 - SNOWDOWN (W,A). Opening a discussion. Aust.Vet.J. 1958,34,417.

118 - SWIFT (B,L). Ram epididymitis. A study on infertility. Cornell Vet. 1970,60,2,204 - 214.

119 - SYUSYUKIN (V,A) et OB'EDKOV (G,A). Detection of Brucella ovis antibodies in rams with infectious epididymitis. Dostizheniya Veterinarnoi Nauki Peredgovo Opyta, Zhivotnovodstvu, 1978,4,21-22.

120 - THOEN (C,O), HOPKINS (M,P), AMBRUST (A,L), ANGUS (R,D) et PIETZ (D,E). Development of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay for detecting antibodies un sera of Brucella suis infected swine. Can.J.Comp.Med.1980,44, 3,294-298.

121 - THOEN (C,O), PIETZ (D,E), AMBRUST (A,L) et HARRINGTON (R). Enzyme immunoassay for detecting Brucella antibodies in cow's milk. J.Clin. Microbiol. 1979,10,2,222-225.

122 - TODOROV (T), KUZETSOV (V) et KOLEVA-TODOROVA (P). Nucleotide composition of various Brucella species, including Brucella ovis. Veterinariya, 1972,9,27-31.

123 - TRILENKO (P,A). Slow complement fixation test for infectious epididymitis in rams. Veterinariya,1970,8,107-109.

124 - TUDORIU (C,D). Sur la nature de Brucella ovis. Bull.Off.Int.Epizoot. 1965,63,7-8,1313-1317.

125 - TUDORIU (C,D), ANDREI (M), KAMBIR (M) et MOLDOVENAENU (P). Epididymitei berbiciolor. (1959). Abstract in Vet.Bull.1960,30,302.

126 - WATT (D,A). Investigation of ovine brucellosis in merino rams of Western Australia. Aust.Vet.J.1970,46,10,506-508.

127 - WATT (D,A). Testicular pathology of merino rams. Aust.Vet.J. 1978, 54,10,473-478.

128 - WATTS (P,S). Genital infections of sheep with particular reference

to Brucella-like organisms. Aust.Vet.J.1955,31,1,1-6.

129 - WEBB (R,F) et QUINN (C,A). Evaluation of the procedures for the diagnosis of Brucella ovis infection in rams. Aust.Vet.J.1980,56,172-175.

130 - WEDDLE (W). An automated CFT for Brucella ovis in sheep. N.Z.Vet.J. 1974,22,1-2,1-4.

131 - WELLINGTON (N,A,M). Epididymitis of rams. Aust.Vet.J.1955,31,10.

132 - WEST (D,M) et BRUERE (A,N). Accreditation for freedom from ovine brucellosis. N.Z.Vet.J.1979,27,263-265.

133 - WORTHINGTON (R,W), TONDER (E,M) et MULDERS (M,S,G). The incidence of Brucella ovis infection in south african rams. A serological survey. J.South African Med.Vet.Ass. 1972,43,1,83-85.

134 - ZAMOR (A), CHAHUAN (E), POLETTE (M), ALONSO (O), ROJAS (X), KRUSE (J) et HERVE (M). Brucella ovis and other aetiological agents in infectious epididymitis and orchitis of rams. Archos.Med.Vet.Chile,1977,9,2, 94 - 99.